

Rossz vízoldhatóságú antifungális szer formulációja nanorendszerek segítségével

Doktori értekezés

Dr. Füredi Petra

Semmelweis Egyetem

Gyógyszerésztudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Klebovich Imre, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Újhelyi Gabriella, Ph.D., c. egyetemi docens
Kovácsné Dr. Balogh Judit, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Takácsné Dr. Novák Krisztina, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Lemberkovich Éva, D.Sc., egyetemi tanár

Budapest

2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	6
1. Bevezetés	8
1.1. Bevezetés	8
1.2. Irodalmi áttekintés	9
1.2.1. Folyékony gyógyszerformák	9
1.2.2. Oldatos gyógyszerformák	9
1.2.3. Az oldhatóság jelentősége	13
1.2.4. Oldhatóság befolyásolásának hagyományos lehetőségei	15
1.2.4.1. Oldékonyságnövelés pH beállítással	15
1.2.4.2. Oldékonyságnövelés koszolvenszek alkalmazásával	16
1.2.4.3. Oldékonyságnövelés szolubilizálással	17
1.2.5. Az oldhatóság növelésének legújabb lehetőségei	19
1.2.5.1. Oldékonyságnövelés liposzómákkal	19
1.2.5.2. Oldékonyságnövelés ciklodextrinekkel	21
1.2.5.3. Albumin szerepe az oldhatóság növelésében	24
1.2.5.3.1. Albumin alapú nanorendszerek előállítása	25
1.2.5.3.1.1. Koacervációs módszer	25
1.2.5.3.1.2. Deszolvatációs módszer	25
1.2.5.3.1.3. Nanoparticle albumin bound technológia	26
1.2.5.3.1.4. Nano porlasztva szárítás	27
1.2.5.3.1.5. Emulzifikációs módszer	27
1.2.5.3.2. Albumin alapú nanorendszerek előnye és felhasználása	28
1.2.5.4. Lipid alapú nanorendszerek és szerepük az oldhatóságnövelésben	29
1.2.5.4.1. Lipid alapú nanorendszerek előállítása	31

1.2.5.4.1.1. Szilárd lipid nanorendszer formulálása HPH-val	33
1.2.5.4.1.2. Szilárd lipid nanorendszer formulálása ultraszonikálással	34
1.2.5.4.1.3. Szilárd lipid nanorendszer formulálása oldószer elpárologtatással	34
1.2.5.4.1.4. Szilárd lipid nanorendszer formulálása mikroemulziós módszerrel	35
1.2.5.4.2. Lipid alapú nanorendszerek felhasználásának lehetőségei	35
2. Célkitűzés	37
3. Anyagok és Módszerek.....	39
3.1. Felhasznált anyagok és fő tulajdonságaik	39
3.1.1. Vorikonazol, mint hatóanyag	39
3.1.2. Reagensek és törzsoldatok	40
3.1.2.1. Nab [®] technológia fejlesztéséhez felhasznált reagensek	40
3.1.2.2. Lipid nanorészecske formulálásához felhasznált reagensek	40
3.2. A felhasznált módszerek.....	41
3.2.1. Vorikonazol tartalmú albumin nanorészecske formulálása	41
3.2.1.1. Nab [®] technológia bemutatása	41
3.2.1.2. A kiindulási elegy elkészítése.....	42
3.2.1.3. Nagy nyomású homogenizálás	42
3.2.1.4. A szerves oldószer eltávolítása	45
3.2.1.4.1. Nitrogén bepárlás.....	46
3.2.1.4.2. Rotációs vákuumbepárló	47
3.2.1.4.3. Liofilizálás	47
3.2.2. Vorikonazol tartalmú SLN formulálásához felhasznált módszerek	49
3.2.3. Az albumin nanorészecskék karakterizálására használt módszerek.....	49
3.2.3.1. Az albumin nanorészecskék méretének meghatározása	49
3.2.3.2. Az albumin nanorészecskék hatása a vorikonazol oldhatóságára	50
3.2.3.3. Differenciál pásztázó kalorimetria (DSC)	51

3.2.3.4. Hatóanyagleadás vizsgálata.....	52
3.2.4. A szilárd lipid nanorészecskék karakterizálására használt módszerek.....	53
3.2.4.1. Szilárd lipid nanorészecske méretének meghatározása.....	53
3.2.4.2. A szilárd lipid bezárási hatásfokának meghatározása	53
3.2.4.3. Differenciál pásztázó kalorimetriás vizsgálat.....	54
3.2.4.4. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia	54
3.2.4.5. A lipid nanorészecskék hatóanyagleadó képességének vizsgálata.....	55
3.2.4.6. A lipid nanorészecskék antimikotikus aktivitásának meghatározása	55
4. Eredmények	56
4.1. A Nab [®] technológia eredményei	56
4.1.1. A nagy nyomású homogenizálás optimalizálása.....	56
4.1.2. A szerves oldószer eltávolítása.....	59
4.1.2.1. Nitrogénárammal történő bepárlás	59
4.1.2.2. Rotációs vákuumbepárlás	59
4.1.2.3. Liofilizálás	59
4.1.3. A kiindulási elegy optimalizálása.....	60
4.1.4. A DSC vizsgálat eredménye.....	62
4.1.5 Az albumin nanorészecske hatóanyagleadó képessége	63
4.2. Vorikonazol tartalmú lipid nanorészecskék formulációs eredményei.....	64
4.2.1. Lipid nanorészecskék formulálása nagy nyomású homogenizátorral	64
4.2.2. A kiindulási emulzió összetételének optimalizálása	65
4.2.3. DSC vizsgálat eredményei VCZ-SLN esetén.....	67
4.2.4. FTIR vizsgálat eredményei VCZ-SLN esetén.....	69
4.2.5. A VCZ-SLN in vitro hatóanyagleadó képességének vizsgálata.....	72
4.2.6. VCZ-SLN antimikotikus aktivitásának vizsgálata	73
5. Megbeszélések	74

5.1 Nab [®] technológia során kapott eredmények értékelő megbeszélése.....	74
5.2 A formulált VCZ tartalmú LN-kék eredményeinek a megbeszélése	79
6. Következtetések	82
7. Összefoglalás	85
8. Summary	86
9. Irodalomjegyzék	87
10. Saját publikációk jegyzéke	96
10.1. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények jegyzéke	96
10.2. Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények jegyzéke.....	96
11. Köszönetnyilvánítás.....	97

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Teljes név	Angol megfelelő
A ⁻	ionizált savas karakterű anyag	dissociated weak acid
ACN	acetonitril	acetonitrile
AUC _{0-∞}	vérszint görbe alatti terület	area under curve
BCS	Biofarmáciai Osztályozási Rendszer	Biopharmaceutics Classification System
BDDCS	Biofarmáciai Hatóanyag Diszpozíciós Osztályozási Rendszer	Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System
BH	bezárási hatásfok	entrapment efficiency
BSA	marha szérum albumin	bovin serum albumin
CD	ciklodextrin	cyclodextrin
CMC	kritikus micellaképzési koncentráció	critical micelle concentration
DAD	diódasoros detektor	diode array detector
DSC	differentiál pásztázó kalorimetria	differential scanning calorimetry
FTIR	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia	Fourier-transform infrared spectroscopy
GIT	gasztrointesztinális traktus	gastrointestinal tract
GUV	óriás méretű unilamelláris vezikula	giant unilamellar vesicles
HA	ionizálatlan savas karakterű anyag	undissociated weak acid
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia	high-performance liquid chromatography
HPH	nagy nyomású homogenizálás	high pressure homogenization
HSA	humán szérum albumin	human serum albumin
LN	lipid nanorendszer	lipid nanosystem

Rövidítés	Teljes név	Angol megfelelő
LUV	nagy méretű unilamelláris vezikula	large unilamellar vesicles
Nab [®]	albuminhoz kötött nanorészecske	nanoparticle albumin bound
NLC	nanoszerkeztelt lipid hordozó	nanosubstructed lipid carriers
PBS	10 mM foszfát pufferes sóoldat	phosphate buffered saline
PDI	polidiszperzitás index	polydispersity index
PEG	polietilén glikol	polyethylen glycol
PG	polipropilén glikol	polypropylene glycol
PGE ₁	prostaglandin E1	prostaglandin E1
pH	hidrogén ion aktivitás	potential of hydrogen
PIO	polioxietilén izosorbit oleát	polyoxyethylene isosorbide oleate
pK _a	savi disszociációs állandó	acid dissociation constant
PPC	L- α -foszfatidilkolin	L- α -Phosphatidylcholine
PSO	polioxietilén sorbitol oleát	polyoxyethylene sorbitol oleate
RES	retikuloendoteliális rendszer	reticuloendothelial system
SBE- β -CD	sulfobutiléter- β -ciklodextrin	sulfobutylether- β -cyclodextrin
SLN	szilárd lipid nanorészecske	solid lipid nanoparticles
SPARC	ciszteinben gazdag, savas szekretált fehérje	secreted protein acid and rich in cysteine
SUV	kisméretű unilamelláris vezikula	small unilamellar vesicles
VCZ	vorikonazol	voriconazole

1. Bevezetés

1.1. Bevezetés

Gyógyszermolekulák esetén a „rossz oldhatóság” alatt az alacsony vízdoldhatóságot értjük. Testünk 60%-a víz, a benne lezajló folyamatok ebben vizes a közegben játszódnak le. A gyógyszermolekula terápiás hatását a célszervben akkor képes kifejteni, ha a szervezet víztereiben oldott állapotban van, és ha a receptor környezetében eléri terápiás koncentrációt.

Az újonnan szintetizált hatóanyagok jelentős hányada nem csak rossz oldhatósággal, hanem rossz biohasznosulással is rendelkezik. Régen is és ma is kihívást jelent a gyógyszerfejlesztők számára, az olyan hordozó és segédanyag rendszerek fejlesztése, melyek képesek kompenzálni a gyógyszermolekula rossz fizikai-kémiai tulajdonságait és segíteni a biohasznosulását.

A hagyományos gyógyszer technológiai megoldásokon kívül az elmúlt évtizedben egyre nagyobb hangsúllyal jelennek meg a modern formulációt segítő módszerek és segédanyagok, amelyek terápiás szempontból előnyösebb tulajdonságú készítmények kialakítását teszik lehetővé. Az új generációs technológiai megoldások közé tartozik a nanotechnológia is. Nanotechnológiáról a gyógyszerészetben az általános definíció szerint akkor beszélünk, ha a gyógyszerhordozó rendszer mérete 10-1000 nm mérettartományba esik. A széles tartomány oka, hogy különböző nanorendszer esetén más-más kritériumnak kell megfelelni. A nanotechnológia gyógyszeripari elterjedésével számos potens hatóanyag kerülhet olyan új gyógyszerformába, amely képes növelni a farmakon vízdoldhatóságát és a biohasznosulását, vagy akár mérsékelni a nem kívánatos mellékhatását.

Dolgozatom első felében szeretném definiálni az oldhatóság fogalmát és jelentőségét, majd bemutatni hogyan befolyásolható a tradicionális gyógyszer technológiai módszerekkel és a mai modernkori megoldásokkal. Az irodalmi áttekintés során két nanotechnológiai módszert, melyet a kísérletes munkám során használtam, részletesen szeretnék ismertetni. Majd a két nanotechnológiai módszer alkalmazásával egy választott rossz vízdoldhatóságú antifungális szer formulációs lépéseit és korlátait ismertetem a kísérletes munkám során.

1.2. Irodalmi áttekintés

1.2.1. *Folyékony gyógyszerformák*

A gyógyszerformák halmazállapota szerint beszélhetünk folyékony, félszilárd és szilárd gyógyszerformákról. Ha a hatóanyag a folyékony halmazállapotú vivőanyagban van oldva, emulgeálva vagy szuszpendálva, akkor folyékony gyógyszerformáról beszélünk. A készítmény felhasználásának helye szerint megkülönböztetünk többek között rektális és vaginális oldatokat, szemcseppeket, fülcseppeket, orrcseppeket, bevételre szánt oldatokat, szirupokat, emulziókat és szuszpenzikókat, parenterális injekciókat és infúziókat. Gyógyszertechnológiai szempontból törekszünk arra, hogy a hatóanyag oldott formában legyen a folyékony gyógyszerformában. A steril oldatos készítmények a folyékony gyógyszerformák közül a legnagyobb kihívást jelentik, hiszen ezekben nemcsak a hatóanyag oldhatóságát kell biztosítani a szervezet számára tolerálható közegben, hanem a készítmény mikrobiológiai tisztaságát is (Antal, 2007).

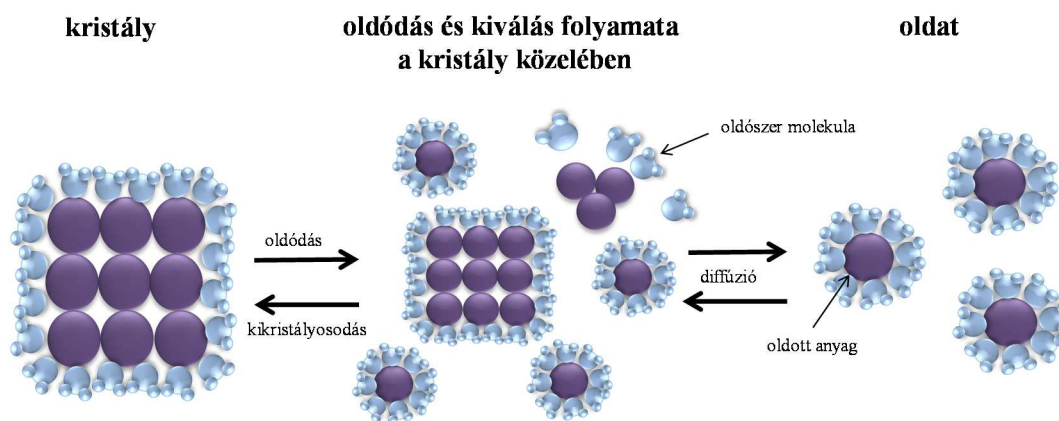
1.2.2. *Oldatos gyógyszerformák*

Az oldatok definíció szerint, olyan legalább két komponensből álló, bevételre vagy külső használatra szánt, üledékmentes és tiszta folyékony gyógyszerformák, melyben a hatóanyag tartósan diszpergálva van. A diszpergálás az oldószer, a diszperz rész pedig az oldott anyag, amely többnyire szilárd, de lehet folyékony és gáz halmazállapotú is. A diszperz fázis mérete szerint csoportosítva megkülönböztetünk valódi és kolloid oldatokat. Valódi oldat esetén az oldott anyag részecskemérete nem haladhatja meg az 1 nm-et, ilyenkor ionosan vagy molekulárisan van diszpergálva az oldószer közegében. Kolloid oldat esetén a diszperz rész részecskemérete 1 és 500 nm közé esik. Aszerint, hogy az oldott anyagra nézve az oldószer oldhatósága maximális egy adott hőmérsékleten, beszélünk telített oldatról. Ha az oldott diszperz rész anyag koncentrációját tovább növeljük a telített oldathoz képest, akkor túltelített instabil rendszer keletkezik, amelyből az oldott anyag már kiválik.

Aszerint, hogy az oldódás során milyen folyamat játszódik le, fizikai vagy kémiai oldódást különböztetünk meg. Fizikai oldódás során az oldott anyag molekulái szolvatálódnak. Ha vizes közegben zajlik le az előbbi folyamat, akkor pedig

hidratálódásról beszélünk. A szilárd kristály felületéről az oldószermolekulák hatására részecskék szakadnak le, amiket ezek után egy oldószer burok vesz körül. Az oldószer molekulák és az oldott anyag között kialakult laza kötőerők hatására az oldott anyag már szabadon, külső behatás nélkül mozog, azaz diffundál az oldószer közegében, ezzel homogén eloszlást biztosítva az oldott anyagra nézve. Az oldódás addig tart, amíg a rendszerben koncentrációkülönbség áll fenn. A ritkábban előforduló kémiai oldódás során kémiai reakció játszódik le: mind az oldandó anyag, mind az oldószer részt vesz a termék képzésében (Antal, 2007).

Az oldódás folyamatának rövid vázlatát az **1. ábra** szemlélteti. Attól függetlenül, hogy fizikai vagy kémiai oldódásról beszélünk, a folyamat minimálisan három lépésben játszódik le. Az első lépésben az oldószernek el kell jutni az oldandó anyaghoz, majd a határfelületeken végbemegy az oldódás ott kialakítva egy magasabb koncentrációjú oldatréteget. Ebből a telített oldatrétegből vagy kikristályosodik az oldandó anyag, vagy a már említett diffúzió segítségével az alacsonyabb koncentrációjú oldat belseje felé mozog. Ez az oldódás folyamatának sebesség meghatározó része, hiszen a diffúzió a legidőigényesebb folyamat.



1. ábra Az oldódás során lezajló folyamatok (saját készítésű ábra)

Az **1. ábra** segítségével az is belátható, ha a kristályba rendezett részecskéket aprítjuk, akkor a solvatáció folyamata gyorsítható. A diffúziós folyamatnak kedvez, a

melegítés és a keverés alkalmazása. Ahhoz, hogy belássuk, mi befolyásolhatja még az oldódás sebességét, érdemes definiálni azt.

Szilárd anyagok esetén, az oldódási sebességen az időegység alatt egységnyi felületen oldatba ment molekulák (ionok) számát értjük. Az oldódási sebesség leírásának első megközelítését 1897-ben Noyes és Whitney írta le. Vizsgálatuk során a benzoesav és ólom-klorid oldódási sebességének jellemzésére az alábbi egyenletet határozták meg:

$$\frac{dc}{dt} = k(c_s - c) \quad (1)$$

mely szerint a koncentráció időegység alatti változása arányos a k oldódási sebességi állandóval, a telítési (c_s) és az aktuális koncentráció (c) által meghatározott koncentráció-gradienssel (Noyes és Whitney, 1897). Ezt az egyenletet dolgozta át Nernst és Brunner, amelyben már fizikai-kémiai és fiziológiás paraméterek is szerepelnek (Dokoumetzidis és mtsai, 2006):

$$DR = \frac{dm}{dt} = \frac{A\delta}{h} \left(c_s - \frac{m_t}{V} \right) \quad (2)$$

ahol

DR	kioldódott hatóanyaghányad
δ	diffúziós állandó
A	szilárd hatóanyag oldószerrel érintkező aktív felülete,
h	felületet körülvevő diffúziós burok rétegvastagsága,
c_s	telítési koncentráció a helyi fiziológiás körülmények között,
V	kioldóközeg térfogata,
m_t	az oldatba került hatóanyag mennyisége t időpontban.

Ebben az egyenletben a kioldódás szempontjából legmeghatározóbb paraméter a telítési koncentráció (c_s), valamint a már oldott hatóanyag mennyisége (m_t) és a diffúziós burok rétegvastagsága (h), mivel ezek határozzák meg a diffúziós burok körüli koncentráció-gradienst, ami a kioldódás hajtóereje.

A Noyes-Whitney összefüggés alapján igazolható az **1. ábra** esetén levont megállapítás, hogy egy adott anyag akkor oldódik gyorsabban, ha nagyobb felületen érintkezik az oldószerrel. Azt a határfelületet, ami érintkezik az oldószerrel, aktív felületnek hívjuk, ami jelentősen függ a nedvesíthetőségtől és a szemcsemérettől. A

nedvesítés során a folyadék behatol a szilárd felület primer részecskéiből álló pórusaiba, kiszorítva onnan a levegőt (Buckton és Newton, 1985).

Egy hatóanyag oldhatóságának megjósolása és befolyásolása az emberi szervezet víztereiben sokkal bonyolultabb feladat, mint ahogy azt elsőre gondolnánk. A fizikai-kémiai paraméterek mellett figyelembe kell venni számos élettani folyamatot, ami hatással lehet az oldhatóságra. Az **1. táblázat**ban összefoglalva mutatom be, hogy melyek azok a fiziológiai körülmények az egyenletekből adódó fizikai-kémiai paraméterek mellett, amelyek hatással vannak az oldódási sebesség értékére.

1. táblázat: A hatóanyag oldódását befolyásoló fizikai-kémiai és fiziológiai tényezők (Dévay, 2009a)

Paraméter	Fizikai-kémiai jellemző	Fiziológiai körülmény
felület (A)	szemcseméret, nedvesíthetőség	fiziológiai felületaktív anyagok (epe)
diffúziós állandó (δ)	molekulatömeg	lumentartalom viszkozitása
diffúziós filmréteg vastagsága (h)		motilitás, hidrodinamikai viszonyok
oldhatóság (c_s)	hidrofil-lipofil jelleg, kristályszerkezet, szolubilizáltság	pH, pufferkapacitás, táplálék-összetevők, epe
oldott hatóanyag-koncentráció ($\frac{dx}{V}$)		permeabilitás (felszívódott mennyiség csökkenti)
térfogat (V)		emésztőnedv, bevételhez használt folyadékmennyiség

1.2.3. Az oldhatóság jelentősége

A potens készítmények fejlesztése a rossz vízoldhatóságú hatóanyagokból, ami a vegyületek közel 30-40%-át teszi ki, a fejlesztők számára egyre nagyobb kihívást jelent. Testünk kétharmada víz, ebben a vizes közegben zajlik le a szervezet összes biokémiai folyamata. Könnyen belátható tehát, ha gyógyszeresen szeretnénk ezeket befolyásolni, akkor elengedhetetlen, hogy az alkalmazni kívánt hatóanyag a test víztereiben oldott állapotban legyen. A gyógyszer technológia során ezért többnyire arra törekszünk, hogy a hatóanyag olyan gyógyszerformában kerüljön be a szervezetbe, ami vagy eleve oldott állapotban tartalmazza vagy pedig alkalmas arra, hogy a szervezetbe kerülve elősegítse annak oldódását és ezáltal a felszívódását. A kívánt hatás kiváltásához elengedhetetlen a felszívódás, amit a hatóanyag oldódási folyamata előz meg.

Leggyakrabban a gyógyszerek szilárd perorális gyógyszerformában (tabletta, kapszula) kerülnek alkalmazásra. A gasztrointesztinális traktusban (GIT) lévő körülmények jelentős mértékben befolyásolják a hatóanyag felszabadulását a készítményből. Az összetett felszívódási folyamatot a szervezet fiziológiás karaktere mellett, a hatóanyag és a gyógyszerforma tulajdonságai is egyaránt befolyásolják. A nem megfelelő felszívódásnak több oka lehet: ha a hatóanyag nem a kellő időben szabadul fel a gyógyszerformából, ezért nincs oldott állapotban a felszívódásra alkalmas helyen, vagy ha a kioldódás után adszorbeálódik, komplexbe kerül, bomlást szenved, vagy ha a hatóanyag nem képes áthatolni a membrán-barrieren, vagy a béltraktusban first pass metabolizálódik, eliminálódik (epén keresztül) (Dévay, 2009b).

Amidon és munkatársai 1995-ben létrehoztak egy olyan rendszert, amely a hatóanyagokat biofarmáciai tulajdonságaik alapján sorolja kategóriákba (Amidon és mtsai, 1995). Kezdetben a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (Biopharmaceutical Classification System, BCS) kizárólag a bioekvivalencia vizsgálatok szabályozását hivatott segíteni, később azonban széles körben hasznosította a gyógyszeripar, mind a kutatásban, mind a fejlesztésben. A BCS rendszer a jól ismert négy csoportba osztja a hatóanyagokat vizes közegben való oldhatóságuk és a biológiai membránon keresztüli permeabilitásuk szerint. Az osztályokat a **2. táblázat** mutatja be.

2. táblázat: Biofarmáciai Osztályozási Rendszer szerinti csoportosítás (Amidon és mtsai, 1995)

osztály	oldhatóság	permeabilitás
I.	jó	jó
II.	rossz	jó
III.	jó	rossz
IV.	rossz	rossz

A liberalizáció mellett a két fő meghatározó paraméter a felszívódás szempontjából a már említett oldhatóság és a permeabilitás. BCS abban nyújt segítséget, hogy meg lehet jósolni a hatóanyagok viselkedését a felszívódás során. Ezek a paraméterek szoros összefüggést mutatnak a hatóanyag, és gyógyszerforma fizikai-kémiai jellemzőivel (gyártástechnológia, szerkezet, összetétel), így sebesség-meghatározó módon befolyásolják a farmakon felszívódását, valamint segítséget nyújtanak az *in vitro* kioldódási vizsgálatok tervezéséhez (Hörter és Dressman, 2001).

Bevezetésre került három olyan dimenzió nélküli szám, melyek a gyógyszerkészítmények tervezésében segítséget nyújthatnak (Manthena és mtsai, 2004). Az egyik ezek közül a felszívódási arányszám, amely nem más, mint a vékonybélben eltelt tartózkodási idő és az abszorpcióhoz szükséges idő hányadosa. A másik paraméter pedig a dózis arányszám (D_0), melyet az oldhatóság (C_s), a dózis (D_0) és a bevételhez használt víz (általában 250 ml) térfogatának (V_0) összefüggéséből az alábbi egyenlettel számolhatunk ki.

$$D_0 = \frac{D}{V_0 C_s} \quad (3)$$

Továbbá használatos a kioldódási arányszám (D_n), mely a gasztrointesztinális traktus adott szakaszán jellemző tartózkodási idő (t_{res}) és a kioldódáshoz szükséges idő (t_{diss}) hányadosaként kapunk meg. A IV. osztályba tartozó hatóanyagok esetén a felszívódási és kioldódási arányszám értéke alacsony. A II. osztályba tartozó hatóanyagoknál a kioldódás szerepe elsődleges a biológiai hasznosíthatóság szempontjából, mert meghatározza a membrán felszínénél felszívódásra képes oldott hatóanyag

koncentrációját. Ekkor a kioldódási arányszám értéke alacsony, a felszívódási arányszám értéke magas (Löbenberg és Amidon, 2000).

Újabban a gyógyszervegyületek jellemzésére a Biofarmáciai Hatóanyag Diszpozíciós Osztályozási Rendszert (Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System, BDDCS) használják. A hatóanyagok diszpozíciós (eloszlás, metabolizmus, elimináció) tulajdonságainak segítségével előre jelezhető, hogy az I. és II. osztályba tartozó farmakonok metabolitok formájában, a III. és IV. osztályba tartozók változatlan formában ürülnek a szervezetből. A fő különbség a két osztályozási rendszer között az, hogy a BCS a felszívódást modellezve a bioekvivalencia vizsgálatokhoz nyújt inkább segítséget, míg a BDDCS a fő metabolizációs útvonal előre jelzésére (transzporterek, enzimek kölcsönhatások, lehetséges gyógyszer-gyógyszer interakciók) szolgál (Wu és Benet, 2005).

1.2.4. Oldhatóság befolyásolásának hagyományos lehetőségei

Az oldhatóság nem más mint egységnyi oldószerben oldott anyagmennyiség, melynek jele „S”. Mivel nincs egységes SI rendszerben megadott formája, ezért többféle koncentráció egységekben és dimenziókban is megadhatjuk. Leggyakrabban használt mértékegységei a következők: g/100 ml, g/ml, mg/100 ml, mg/ml, mmol/l, mmol/dm³, μmol/dm³. Egy hatóanyag adott oldószerben kialakuló egyensúlyi oldhatóságát leginkább befolyásoló tényezők: az oldószer hőmérséklete, az alkalmazott nyomás, a hatóanyag anyagi minősége, úgy mint kristályforma és méret, az aggregációra való hajlam, továbbá az egyéb jelenlévő felületaktív anyagok, micellaképzők, segédanyagok, segédoldószerek, valamint a közeg pH értéke. Abból, hogy megismerjük, mitől függ leginkább egy anyag oldhatósága, tudjuk kiválasztani a megfelelő eszközt arra, hogy javítsuk azt. Számos lehetőség ismert a hatóanyagok víz oldhatóságának növelésére. Leggyakrabban összetett oldószerrendszerek, segédanyagok alkalmazásával történik. Továbbiakban részletesen bemutatok egy-egy klasszikus oldékonyság növelésre alkalmas eljárást.

1.2.4.1. Oldékonyságnövelés pH beállítással

A legegyszerűbb módja az oldhatóság növelésének, ha a közeg pH-ját választják meg úgy, hogy az ionizáció mértéke kedvezzen az oldhatóságnak. Az inonizálható vegyületek

pH-oldékonyság összefüggését a Henderson-Hasselbach egyenlete írja le. Az oldékonyságot az ionizálatlan vegyületre (HA) vonatkoztatja, és figyelembe veszi az adott pH értéken mért oldékonyságot és a vegyület savi disszociációs állandójának (pK_a) értékét.

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (4)$$

Ebből az egyenletből megállapítható, hogy a savas vegyületek oldékonysága a pH növelésével nő (ha a pH értékek nagyobbak a pK_a értéknél), míg a bázikus vegyületek oldékonysága a pH csökkenésével nő (ha a pH értékek kisebbek, mint a pK_a) (Bhattachar és *mtsai*, 2006). A közeg pH-értékének gyenge savak és bázisok esetén van kiemelt szerepe az oldhatóságra. Ennek a módszernek az alkalmazása azonban korlátozott gyógyszerkészítmények esetén. A fiziológiás pH értéktől jelentősen eltérő formula használata során a szervezet pufferkapacitása hamar kimerül, ami fájdalmas szövetnekrózist okoz (Csóka és *mtsai*, 2008). A szervezet szűk pH tűrése miatt ritkán jelent valós megoldást az oldékonyság pH beállítással történő növelése például parenterális vagy szemészeti készítmények esetén.

1.2.4.2. Oldékonyságnövelés koszolvensek alkalmazásával

A koszolvensek alkalmazásával az oldószer permittivitása változtatható. A permittivitás növelésével a poláris anyagok oldhatósága nő, míg az apoláros anyagoké csökken. Tehát ha rossz vízoldhatóságú apoláros hatóanyagok esetén az oldószerként alkalmazott magas permittivitású vizes közeg egy részét alacsonyabb permittivitású szerves oldószerrel (pl. glicerinnel) helyettesítjük, akkor az anyag oldékonysága növekedni fog. Az alkalmazott oldószerkelet permittivitása, és az oldott anyag koncentrációja közötti kapcsolat exponenciális összefüggéssel írható le. Nayak és munkatársai etoricoxib esetén glicerint, polipropilén-glikolt (PG) és polietilén-glikol 400-at (PEG 400) alkalmaztak a vizsgálatuk során a permittivitás hatásának vizsgálatára. Az alkalmazott koszolvensek közül a PEG 400 alkalmazásával érték el a legmagasabb oldhatóságot. A **3. táblázat** eredményeiből jól látható, hogy a permittivitás és az oldékonyság fordítottan arányos a vizsgált hidrofób nem szteroid gyulladáscsökkentő esetén (Nayak és Panigrahi, 2012).

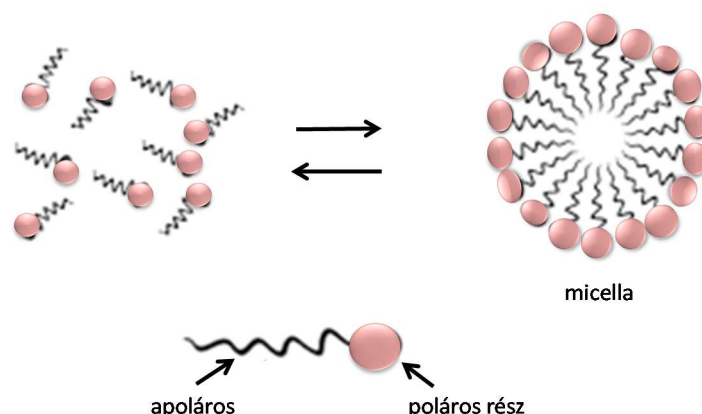
A koszolvenszek révén alacsony polaritású molekulák kerülnek a vizes oldószerbe, ami csökkenti a vízmolekulák közötti hidrogénhidak erősségét. A vízmolekulák közötti erős kölcsönhatások ugyanis erőteljesen „kiszorítják” az apoláris molekulákat az oldatból. Mivel koszolvenszek esetén ez a „kiszorító erő” kisebb, hatékonyan növelik az apoláris anyag oldékonyságát. A növekedés annál nagyobb mértékű, minél kevésbé erősek a koszolvens-koszolvens, vagy a víz-koszolvens kölcsönhatások az oldatban. Ahhoz, hogy egy koszolvens kifejtse hatását szükséges, hogy a koszolvens megfelelő mértékben oldódjon vízben, ugyanakkor a poláris része a vízzel kölcsönhatva tartsa oldatban az apoláris részt (Millard és *mtsai*, 2002).

3. táblázat A szobahőmérsékleten vizsgált etoricoxib oldhatósága különböző víz és polietilén-glikol 400 tartalmú elegyek esetén (Nayak és Panigrahi, 2012)

Víz tartalom (v/v %)	PEG 400 (v/v %)	Permittivitás	Etoricoxib oldékonyság (mg/ml)
0	100	12,50	2,19 ± 0,083
10	90	19,00	2,08 ± 0,065
20	80	25,59	1,76 ± 0,051
30	70	32,19	1,43 ± 0,044
40	60	38,78	1,16 ± 0,033
50	50	45,38	0,83 ± 0,021
60	40	51,98	0,60 ± 0,009
70	30	58,57	0,38 ± 0,006
80	20	65,17	0,27 ± 0,004
90	10	71,76	0,16 ± 0,004
100	0	78,36	0,08 ± 0,002

1.2.4.3. Oldékonyságnövelés szolubilizálással

A micellák által közvetített oldhatóságnövekedést szolubilizálásnak nevezzük. A micellák poláris és apoláris molekularészből felépülő amfipatikus molekulák (**2. ábra**).



3. ábra A micellák szerkezete (saját készítésű ábra)

A micella jellegzetes gömb szerkezete akkor alakul ki, amikor a felületaktív amfipatikus molekula koncentrációja elér egy adott értéket, ami nem más, mint a jól ismert kritikus micellaképzési koncentráció (CMC). A CMC az adott felületaktív anyagra jellemző érték és ekkor következik be az, hogy az amfifil molekula valódi oldata micellákat tartalmazó kolloid oldattá alakul át. A micellák szerkezetét alapvetően az oldószer polaritása befolyásolja. Poláris közegben az apoláris csoportok asszociálódnak a poláris részek pedig a közeg felé irányulnak, ahogyan a 2. ábrán is látható. Míg apoláris közegben a molekularészek elhelyezkedése ezzel ellentétes irányú. Az apoláris jellegű molekulák vízzoldékonysága úgy növelhető, hogy az oldani kívánt anyag a micellák belső, apoláris részébe épül be (Csóka és *mtsai*, 2008). Szolubilizálásra klasszikus példa a gyógyszerészetben az aromás vizek előállítása, mely során az apoláros tulajdonságú illóolajokat felületaktív anyag segítségével oszlatják el a vízben.

A felületaktív anyagok szerkezetük alapján két nagy csoportra oszthatók: ionos, vagy nem ionos. Az ionosokat tovább oszthatjuk töltésük szerint, így megkülönböztetünk anionos (negatív töltésű), kationos (pozitív töltésű) és ikerionos (egyaránt negatív és pozitív töltésű) felületaktív anyagot.

Alkalmazásuknak gátat szab az, hogy a szervezet nem képes bármennyi felületaktív anyagot tolerálni. Azt, hogy milyen koncentrációban képes a felületaktív anyagot a szervezet elviselni, nagyban függ az alkalmazott vegyület tulajdonságaitól és az alkalmazás módjától. Általánosságban azonban elmondható, hogy a nem ionos szerkezettel rendelkezőket a szervezet jobban tolerálja (Abelson és Anderson, 2006;

Kovács és mtsai, 2009; Yiyun és Jiepin, 2006). Li és munkatársai docetaxol kemoterápiás szert tartalmazó micellákat állítottak elő különböző nem ionos felületaktív anyag - poliszorbát 80, polioxietilén szorbitol oleát (PSO), polioxietilén izosorbit oleát (PIO) - segítségével. A hemolitikus index meghatározása során megállapították, hogy a PSO, ami szerkezetét tekintve egy összetett amfifil molekula, kevesebb hemolízist okoz, mint a PIO. A PSO csak egy hidroxil csoporttal rendelkezik, így hidrogénhidak segítségével nem tud molekulakomplexet létrehozni, míg a PIO egy izosorbit származék, ezért könnyen képez molekulakomplexet. A PIO molekulakomplexe nagyobb lipofilitással rendelkezik a PSO önnálló formájához képest, ezért nagyobb affinitással kötődik az eritrociták membránjához, a sejt sérülését okozva ezzel (Li C. és mtsai, 2014).

1.2.5. Az oldhatóság növelésének legújabb lehetőségei

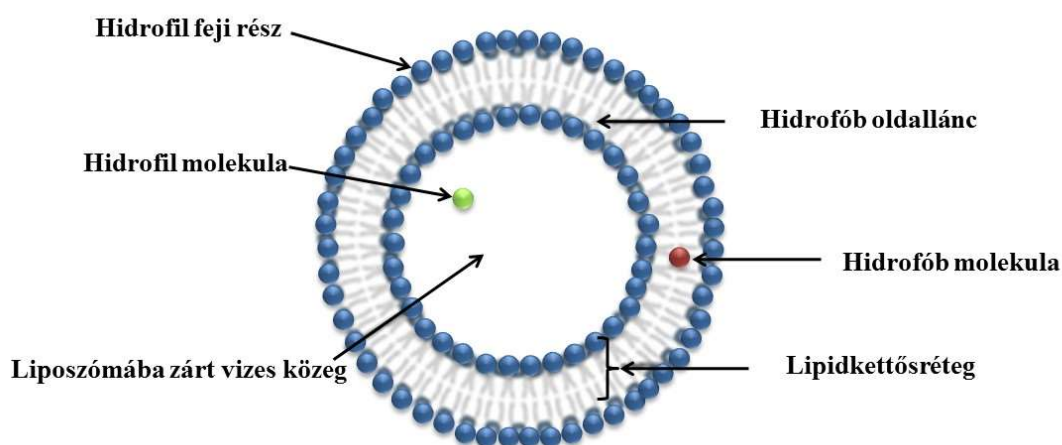
Ostwald elmélete szerint a részecskeméret csökkenése esetén megnő az oldhatóság. Azonban azt is megfigyelték, hogy polidiszperz szuszpenzió esetén a monomerek vándorlásának hatására a nagyobb szemcsék mérete a kisebbek rovására növekszik (Qin-bo és mtsai, 2005). Tovább vizsgálva a szemcseméret szerepét az oldhatóságra, a felületi töltés szerepére is fény derült. Ezek szerint a szemcseméret csökkentése során egy bizonyos határértéknél maximális oldhatóságot kapunk (Symchowicz és Katchen, 1968). A szemcseméret csökkentésével nő a szilárd és folyékony halmazállapotú részecskék határfelülete, ami növeli az oldódási sebességet, továbbá a kisebb szemcséknél a diffúziós burok vastagsága is kisebb, segítve ezzel a diffúziós folyamatokat.

Ezek után belátható, hogy rossz vízoldhatóságú hatóanyagok oldhatósága kedvezően befolyásolható, ha nanoméretű hordozórendszert alakítunk ki. Sajnos a technológiának gátat szab egy negatív irányú folyamat, melyet az apróbb szemcsék agglomerációs hajlamának növekedése okoz (Leuner és Dressman, 2000). A modern oldhatóságnövelő nanorendszerek egyesítik a részecskecsökkentésben rejlő potenciált a hagyományos felületaktív anyagok által mediált oldhatóság növekedéssel.

1.2.5.1. Oldékonyságnövelés liposzómákkal

A liposzómák foszfolipid kettősfallal határolt vezikulák. Méretük a néhány tízed nanométertől a néhány mikrométerekig terjedhet. Szerkezetüket tekintve két nagy

csoportba sorolhatjuk azokat aszerint, hogy hány lipid kettősréteg veszi körül. Ha több lipid kettősréteg, akkor multilamelláris vezikulákról, ha egy réteg, akkor unilamelláris vezikuláról beszélhetünk (Akbarzadeh és *mtsai*, 2013). Az unilamelláris vezikulák méretük alapján tovább csoportosíthatók kis, nagy és óriás vezikulákra. Az eszerint megkülönböztetett liposzómák a következők: kicsi unilamelláris vezikulum (SUV) (~30-100 nm), nagy unilamelláris vezikulum (LUV) (100 nm-1 μ m) és óriás unilamelláris vezikulum (GUV) (1 μ m felett) (Amarnath és Sharma, 1997). A különböző méretű liposzómák különböző mennyiségű vizet képesek magukba zárni, ami befolyásolja stabilitásukat. A hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonsága határozza meg, hogy milyen típusú liposzóma alkalmas leginkább hordozórendszerének, melyikkel érhető el a maximális bezárási hatásfok (BH). A bezárandó molekula polaritása meghatározza az elhelyezkedését a liposzómában. A poláris tulajdonságúak a liposzóma belsejében, míg az apolárosak a lipid kettősrétegben helyezkednek el (**3. ábra**).



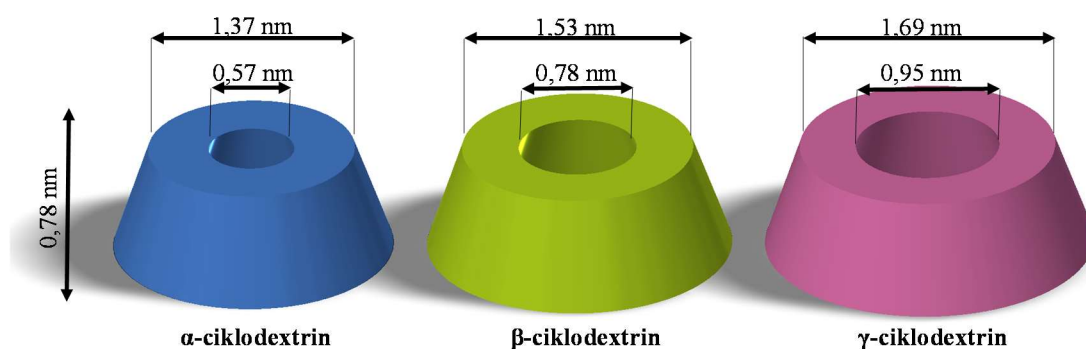
3. ábra A különböző polaritású hatóanyagok elhelyezkedése a liposzóma szerkezetében (saját készítésű ábra)

A liposzómákat a szervezet retikuloendoteliális rendszere (RES) felismeri, ezért parenterális felhasználásuk korlátozott. Európában *Caelyx*[®] néven van forgalomban egy doxorubicin tartalmú liposzómális kemoterápiás szer. A liposzóma mérete (100-200 nm) alkalmas arra, hogy a tumorsejtek érhalózatán keresztül a tumorsejtekbe jusson (Abraham és *mtsai*, 2005). Azért, hogy az immunrendszer fagocita sejtjei nehezebben, illetve ne ismerje fel a liposzómát testidegen molekulaként, a lipidmolekulákat pegilálják, emiatt az ebből képződő liposzóma kap egy polietilén-glikol burkot. Az így létrehozott

liposzóma az úgynevezett lopakodó liposzóma (Gabizon és Martin, 1997). A „lopakodó liposzóma” felszíne semleges, ami a komplement rendszert nem aktiválja, szemben a töltéssel rendelkező vezikulumokkal (Chonn és *mtsai*, 1991).

1.2.5.2. Oldékonyságnövelés ciklodextrinekkal

A ciklodextrinek (CD) hat, hét vagy nyolc α -D-glükopiranoz egységből álló ciklikus, nem redukáló oligoszacharidok (**4. ábra**). A csonka kúp alakú, belső üreggel rendelkező molekulák belseje apoláris, míg külső felülete poláris természetű. A poláris külső felületi sajátságok miatt ezek a molekulák vízben oldódnak, képesek különböző kémiai szerkezetű apoláris molekulákat a belső üregbe zárni, ezzel kialakítva egy úgynevezett zárványkomplexeiket. Ezt az asszociációs molekulakomplexeiket másodlagos kötőerők tartják össze (Loftsson és Brewster, 1996; Sebestyen és *mtsai*, 2013). A zárványkomplex fizikai-kémiai tulajdonságai eltérőek a vendégmolekula kiindulási karakterétől.



4. ábra A különböző számú glükopiranoz egységből felépülő ciklodextrinek (saját készítésű ábra)

Előnyösen alkalmazható a jobb stabilitás, magasabb vízdoldékonyság, jobb biohasznosulás elérése érdekében (Duchene és *mtsai*, 1999).

A zárványkomplex kialakulását számos esetben használják ki rossz vízdoldhatóságú gyógyszermolekulák oldhatóságának növelésére. Számos esetben ehhez speciális, kémiaailag módosított származékokat állítanak elő. A különböző származékok nem csak a hozzájuk kapcsolódó szubsztituensek helyzetében és hosszában, hanem a kémiai kötés természetében is különböznek. A hatóanyagok befogadását gátolja a ciklodextrin külső

felszínének poláris természete. Ezért kidolgoztak a hagyományos komplexképző technika mellett egy ciklodextrin nanocsapadékképzésen alapuló módszert. A CD nanocsapadék képzéshez először a ciklodextrint szerves oldószerben oldjuk, ami többnyire alkoholt jelent, és ezt az oldatot keverés közben vízbe öntjük. Az elegyítés hatására keletkezik a nanodiszperz rendszer, melynek a kialakuláshoz nem szükséges más felületaktív anyag jelenléte. Hiszen az eljárás során egy amfifil tulajdonságú ciklodextrint használnak fel, csökkentve ezáltal a külső burok hidrofilitását. További előnyös hatása az amfifil CD-nek, hogy növelhető a biológiai membránokhoz való affinitás a természetes ciklodextrinekhez képest (Memisoglu és *mtsai*, 2003). Bilensoy és munkatársai 6-O-CAPRO- β -CD amfifil tulajdonságát használták ki paclitaxel tartalmú ciklodextrin tartalmú nanorészecske formulálásához. Ezzel háromszor nagyobb paclitaxel koncentrációt sikerült elérni a hagyományos komplexképzéshez képest (Bilensoy és *mtsai*, 2008).

A csapadékképző módszer mellett létezik egy úgynevezett emulziós és oldószer elpárologtatásos technika. Ilyenkor a ciklodextrint olyan szerves oldószerben oldjuk, ami nem elegyíthető vízzel, és az oldatot keverés közben vízbe öntjük, majd a szerves oldószer elpárologtatjuk. Ebben az esetben szükséges más felületaktív anyag alkalmazása (Duchene és *mtsai*, 1999).

Vorikonazol (VCZ) tartalmú injekció formulálásához szulfobutiléter- β -ciklodextrint alkalmaztak a hatóanyag vízdékonyságának a növelésére (Hafner és *mtsai*, 2010). A segédanyag hátránya abban van, hogy beszűkült vesefunkciójú betegek esetén felhalmozódik és hemolízis okozhat (Burkhardt és *mtsai*, 2010; Luke és *mtsai*, 2012).

A ciklodextrineket folyékony gyógyszerkészítményekben gyakran alkalmazzák. A **4. táblázat** reprezentál néhány példát arra, hogy a ciklodextrineket milyen forgalomban lévő folyékony gyógyszerkészítményekben alkalmazzák oldékonyságnövelő segédanyagként.

4. táblázat A ciklodextrinek felhasználása forgalomban lévő készítményekben
(Brewster és Loftsson, 2007)

Ciklodextrin	Farmakon	Kereskedelmi név	Formuláció	Gyógyszergyártó cég
α -ciklodextrin	alprosztiladil	<i>Caverject</i> [®] <i>Dual</i> [®]	i.v. oldat	Pfizer
α -ciklodextrin	PGE ₁	<i>Prostavasin</i> [®]	parenterális oldatok	Ono Schwarz
β -ciklodextrin	iodin	<i>Mena-Gargle</i> [®]	oldat	Kyushin
β -ciklodextrin	piroxikám	<i>Cicladon</i> [®]	oldat	Aché
2-hidroxi-propil- β -ciklodextrin	hidrokortizon	<i>Dexocort</i> [®]	oldat	Actavis
2-hidroxi-propil- β -ciklodextrin	indometacin	<i>Indocid</i> [®]	szemcsepp	Chauvin
2-hidroxi-propil- β -ciklodextrin	itrakonazol	<i>Sporanox</i> [®]	i.v. oldat	Janssen
2-hidroxi-propil- β -ciklodextrin	mitomycin	<i>MitoExtra</i> [®] <i>Mitozytrex</i> [®]	i.v. infúziók	Novartis
metilált β - ciklodextrin	klóramfenikol	<i>Clorocil</i> [®]	szemcsepp	Oftalder
random metilált β -ciklodextrin	17 β - esztradiol	<i>Aerodiol</i> [®]	orrspray	Servier
szulfobutiléter- β -ciklodextrin Na-só	vorikonazol	<i>Vfend</i> [®]	i.v. oldat	Pfizer
szulfobutiléter- β -ciklodextrin Na-só	ziprasidon mezilát	<i>Geodon</i> [®] <i>Zeldox</i> [®]	im. oldatok	Pfizer
szulfobutiléter- β -ciklodextrin Na-só	aripiprazol	<i>Abilify</i> [®]	im. oldat	Bristol-Myers Squibb, Otsuka Pharm.

A 4. táblázat folytatása az előző oldalról

Ciklodextrin	Farmakon	Kereskedelmi név	Formuláció	Gyógyszergyártó cég
szulfobutiléter- β -ciklodextrin Na-só	maropitant	<i>Cerenia</i> [®]	parenterális oldat	Pfizer Animal Health
2-hidroxi-propil- γ -ciklodextrin	Tc-99 teboroxim	<i>Cardio Tec</i> [®]	i.v. oldat	Bracco
2-hidroxi-propil- γ -ciklodextrin	diclofenák	<i>Voltaren</i> [®]	szemcsepp	Novartis

1.2.5.3. Albumin szerepe az oldhatóság növelésében

A gyógyszerkészítményekből a hatóanyag a szervezetbe kerülve felszabadul, majd felszívódva az érpályába jut. Az érrendszerben a hatóanyagok kisebb hányada szabad formában, nagyobb részük szállítófehérjékhez kötődve fordul elő (Yang és mtsai, 2007a). A legáltalánosabb hordozó fehérje az érrendszerben, az albumin. Az albumin számos kötőhellyel rendelkezik, ezért különböző szerkezetű, változatos tulajdonságú hatóanyagokat képes fehérjekomplexbe vinni (Kohita és mtsai, 1994). A hatóanyagok albuminnal alkotott komplexének gyakran kedvezőbb a vízoldhatósága, mint a hatóanyagnak önmagában (Kratz és Elsadek, 2012). Az albumin ezen tulajdonságát kihasználják gyógyszer technológiai szempontból is. A fejlesztések során született meg az albumin-nanorendszerek létrehozása, ami az oldhatóságnövelése mellett számos más előnyös tulajdonsággal bír. Zensi és munkatársai apolipoprotein A tartalmú albumin alapú nanorészecskét állítottak elő, mely így képes átjuttatni a fehérje hatóanyagot a vérágygáton (Zensi és mtsai, 2010). További előnyös jellemző, hogy kemoterápiás szerek célzott tumorsejtbe juttatása is megvalósítható vele. A tumor sejtek túlexpresszáltak SPARC (ciszteinben gazdag, savas szekretált fehérje) fehérjékben. SPARC egy membránfehérje, melynek segítségével a humán szérum albumin (HSA) mediált endocitózisa zajlik le (Desai és mtsai, 2006; Green és mtsai, 2006). Így az albuminhoz kötött kemoterápiás szer célzott bejuttatása a tumor sejtjeiben megvalósítható, a

hatóanyag a tumorsejtekben a SPARC membrán fehérje miatt feldúsítható. Regisztrálva van egy ilyen paclitaxel tartalmú készítmény Abraxane[®] néven, aminél az előbb ismertetett mechanizmust használják fel (Green és *mtsai*, 2006).

1.2.5.3.1. Albumin alapú nanorendszerek előállítása

Alapvetően öt különböző módszer ismert az albumin-nanorészecske előállítására: a Nab[®] (Nanoparticle albumin bound) módszer (Desai, 2008), a kicsapásos/deszolvatációs módszer (Langer és *mtsai*, 2003), az emulzifikációs módszer (Shen és *mtsai*, 2008), a porlasztva szárítás (Nano Spray Drying) (Lee és *mtsai*, 2011) és a micellákba való szervezés (koacervációs módszer) (Wilson és *mtsai*, 2014). Ezek közül a technológiák közül a fontosabbakat részletesen ismertetem.

1.2.5.3.1.1. Koacervációs módszer

A koacervációs módszer során felületaktív anyag nélkül állítják elő a részecskéket. A 7 és 9 közötti pH-jú vizes albumin oldatba acetont csepegtetnek, majd a kialakult nanorészecskéket glutáraldehiddel stabilizálják. A keresztkötési reakciót ezután egy gélpermeációs kromatográfiás tisztítás követi. A módszer hátránya, hogy széles a nanorészecskék méreteloszlása. Nagy nehézséget jelent továbbá a megfelelő pH beállítás puffer alkalmazása nélkül (ezt kizárja a hatására keletkező csapadék, illetve a bekövetkező nanorészecske aggregáció), különösen magas fehérje koncentráció mellett. Lin és munkatársai 100 nm átmérőjű albumin alapú nanorészecskéket állítottak elő. Tapasztalatuk szerint, ha növelték a HSA oldat pH értékét, akkor a részecskék átlagos mérete csökkent. Ez a HSA ionizációjával magyarázható, hiszen magasabb pH értéken az albumin ionizált formája dominál, ami a fehérjemolekulák aggregációjának kedvezőtlen, így kisebb részecskeméretű nanorendszer keletkezik (Lin és *mtsai*, 1993).

1.2.5.3.1.2. Deszolvatációs módszer

A koacervációs módszer továbbfejlesztésével alakult ki a deszolvatációs technika, melynek lényege, hogy HSA vizes oldatához állandó sebességgel kicsapóágenst adagolnak, ami a legtöbbször etanol. Az oldat ionerőssége és pH-ja jelentősen befolyásolja a keletkezett nanorendszer méreteloszlását. Langer és munkatársai

határozták meg az albumin alapú nanorendszerek előállításának kritikus paramétereit és vizsgálták a körülmények hatását a képződött nanorendszerek méreteloszlására. Az ionerősség biztosítására a nátrium-klorid bizonyult a legalkalmasabbnak, a pH optimált tartománya 7-10 közötti. A szobahőmérsékleten folyamatos kevertetés közben állandó sebességgel hozzáadott etanol mennyisége a méretet kevésbé befolyásolja, inkább csak a méreteloszlás szélességére van hatással. A kicsapásos módszernél is szükséges a keresztkötések stabilizálása glutáraldehiddel 24 órán keresztül, mielőtt a befejező lépés, a tisztítás következik. A tisztítás folyamata során a centrifugálás után a felülúszó réteg eltávolítása következik, majd utána vízzel egészítik ki a minta térfogatát. Az előbbi lépéseket ötször megismétlik, eltávolítva ezzel a 70 nm alatti nanorészecskéket, és biztosítva a minta keskeny intervallumú méreteloszlását. Azonban a többszöri mosás jelentős hatóanyagvesztéssel jár (Langer és mtsai, 2003; Storp és mtsai, 2012; Weber és mtsai, 2000).

1.2.5.3.1.3. Nanoparticle albumin bound technológia

A leggyakrabban és legelterjedtebben alkalmazott technika a Nab[®] módszer. A kutatások modell hatóanyaga a rossz vízdoldhatóságú paclitaxel volt. A hatóanyag kémiai módosítása nélkül (észteresítés, sóképzés) a farmakológiai tulajdonságait megtartva sikerült a gyógyszermolekulát humán szérumalbuminhoz kötni. Ehhez első lépésként a rossz vízdoldhatóságú hatóanyagot egy szerves oldószerben feloldják, majd elegyítik a HSA vizes kolloid oldatával. A két rendszerből alakul ki nagy nyíróerők hatására egy nanoméretű diszperz rendszer. A diszpergált nanoméretű cseppeket többnyire nagy nyomású homogenizátor segítségével formulálják. Ezen felül szükséges egy olyan módszer kidolgozása is, amivel a létrejött O/V emulzióból elpárologtatható a szerves oldószer.

A kialakított nanodiszperz rendszer liofilizált porként vagy injekcióként kerül forgalomba, ezért törekedni kell a 200 nm-nél kisebb átmérőjű részecskék előállítására, hiszen ezeken hajtható végre steril szűrés membránszűrőkkel. Hőérzékeny segédanyag alkalmazása esetén a membránszűrés a legkézenfekvőbb sterilizáló eljárás. Az intravaszkuláris használatra szánt fehérje nanorészecskék sterilizálására nem használhatóak a hőközlésen alapuló konvencionális módszerek, így ezek sterilizálását

0,2 μm pórusú membránszűrők alkalmazásával oldják meg. A Nab[®] módszer segítségével egy olyan hordozórendszer készíthető, mely a vérben a hatóanyagot két frakcióban tartalmazza. Az egyik frakció a szervezet számára azonnal hozzáférhető, mert a nanorészecskékből koncentrációfüggő disszociációval szabaddá váló albumin-hatóanyag komplexe alkotja. A másik frakció a nanorészecskébe zárt hatóanyag, ami lényegében egy gyógyszerraktárat képez.

1.2.5.3.1.4. Nano porlasztva szárítás

A porlasztva szárítás alkalmas finom por előállítására folyékony fázisból, ezért albumin alapú nanorendszerek előállítására is lehetséges a segítségével. A nano porlasztva szárítók (Nano Spray Dryer) egy vibrációs hálóval működnek a nanoméretű cseppek előállítása érdekében. A porlasztófej tartalmaz egy mikrométeres nagyságú lyukakkal perforált vékony membránt. A hajtóművet ultrahangos frekvenciával üzemeltetik, amely a membránban vibrációt generál, így precízen meghatározott méretű cseppecskéket juttat a munkatérbe, amit egy elektrosztatikus gyűjtő segítségével fognak be. Az elektrosztatikus gyűjtő egy földelt elektródból (katód), valamint egy hengeres felépítésű részecskegyűjtő elektródból (anód) áll. A becsapódó negatívan töltött részecskék a gyűjtőelektród hengerének belső falához áramlanak a magas feszültség indukálta elektrosztatikus erőter hatására, majd kisülést okoznak a gyűjtő elektródon (Li X. és mtsai, 2010; Faheem és Haggag, 2015).

Lee és kutatócsoportja 120 °C hőmérsékletű, 150 l/perc-es levegőáramlási sebesség mellett 0,1%-os marha szérum albuminból (BSA) 4 μm -es membrán segítségével állítottak elő átlagosan 460 nm átmérőjű nanorészecskéket Nano Spray Dryer B-90 típusú készülékkel (Lee és mtsai, 2011).

1.2.5.3.1.5. Emulzifikációs módszer

Polimer alapú nanorészecskék előállítására alkalmazzák ezt a módszert a leggyakrabban, de albumin alapú nanorendszereket is formulálnak így. Az albumin oldatát egy olajos fázissal többnyire gyapotmagolajjal homogenizálják, majd a képződött emulziót hővel stabilizálják (175-180 °C-on) 10 percig. Az emulziót lehűtik, és etil-

éterrel hígítják, így csökkentve az olajos fázis viszkozitását, hogy elősegítsék a centrifugálás során a szeparálást. Másik lehetőség, ha fehérjeoldatot és az olajos fázist 25 °C-on homogenizáljuk, majd hozzáadjuk az étert, ami tartalmazza a kémiai kötéseket stabilizáló ágenszt is. A kémiai kötések stabilizátora általában 2,3-butadién vagy formaldehid (Elzoghby és mtsai, 2012).

10-hidroxycamptothecin tartalmú BSA nanorészecskéket úgy állítottak elő emulzifikációs technológiával, hogy a fehérjét és a hatóanyagot nátrium-hidroxid oldatban oldották fel, majd ezt a vizes oldatot ricinusolajjal elegyítették, amely 2% Span 80-at tartalmazott. A homogenizálás után kapott emulziót folyamatos kevertetés mellett 140 °C-os ricinus olajba csepegtették. A hőkezelést követően, hagyták szobahőmérsékletre hűlni az emulziót, amit ezután petrol-éterrel homogenizáltak. Majd centrifugálással tisztították a nanorészecskéket úgy, hogy a petrol-éteres fázist mindig dekantálták. Ezáltal olyan 10-hidroxycamptothecin tartalmú 600 nm méretű nanorészecskéket kaptak, amelyek 20 óra után a bezárt hatóanyag 90%-át képesek voltak leadni tripszines 7,4 pH-jú, 10 mM-os foszfát pufferes sóoldatban (PBS) (Yang és mtsai, 2007b).

1.2.5.3.2. Albumin alapú nanorendszerek előnye és felhasználása

A hagyományos gyógyszerhordozókkal szemben az albumin alapú nanorendszer számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik. A Nab[®] módszerrel létrehozott nanorészecskék esetén a hatóanyag egy szilárd magba van zárva, így a részecskékből készített szuszpenzió kis térfogatban is nagyobb dózis beadását teszi lehetővé. A hatóanyag farmakológiai hatását is előnyösen befolyásolja azáltal, hogy az albuminhoz kötött gyógyszermolekula sokkal kevésbé módosul a májban, így a toxikus metabolitok koncentrációja is jóval alacsonyabb értéket ér csak el. A metabolizmus késleltetése növeli a hatóanyag fiziológiai felezési idejét. Szemben a konvencionális segédanyagokkal az alkalmazott HSA egyszerűen, proteolitikus enzimek segítségével bomlik le a szervezetben, az endogén albuminhoz hasonlóan (Stinchcombe, 2007).

A daganatellenes szerek esetében a dózist a vérlemezkék számának jelentős csökkenése korlátozza. Toxikus tulajdonságaik miatt károsodik a csontvelő és mieloszupresszió következik be, ezért két dózis között meg kell várni, amíg a vérlemezke szintje a vérben újra normális értékű lesz. Desai és munkatársai vizsgálatai patkányokon igazolták, hogy

a paclitaxel Nab[®] formulációja kevésbé okoz mielioszupressziót a hagyományos gyógyszerformához képest, továbbá a kezelt patkányok testsúlycsökkenése sem olyan jelentős, mint a hagyományos formula esetén. A mellékhatásprofil kedvező változása lehetőséget teremt a dózis növelésére (Desai és *mtsai*, 1999). Paclitaxel esetén másik jelentős farmakológiai előny, hogy az albuminhoz kötött forma magasabb válaszadási arányt és kedvezőbb toxicitás-profilot mutatott III. fázisban levő mellrákos betegek esetén (Schwartzberg és *mtsai*, 2012). Paclitaxel tartalmú albumin nanorészecskéről több száz irodalmi publikáció született. Nemcsak taxol alapú hatóanyagokat zártak már be albumin alapú nanohordozóba, hanem más kemoterápiás szert (lapatinib, tacrolimus, gemcitabine, doxorubicin, itrakonazol) is. Nyilvánvaló technológiai előnyök mellett kedvező farmakológiai változásokról számoltak be (Chen W. és *mtsai*, 2008; Seo és *mtsai*, 2016; Thao le és *mtsai*, 2016; Wan és *mtsai*, 2016).

1.2.5.4. Lipid alapú nanorendszerek és szerepük az oldhatóságnövelésben

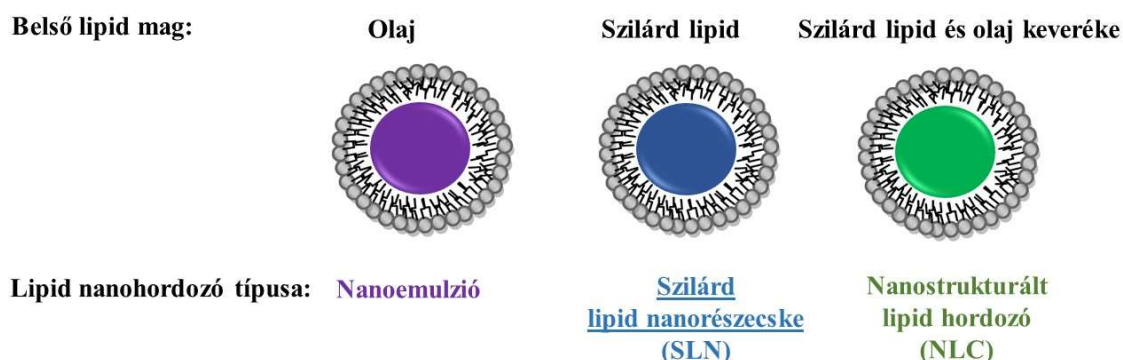
Az első lipid alapú nanorendszernek a nanoemulziókat tekinthetjük, melyek csak a diszpergált részecske méretében különböznek a hagyományos emulzióktól. A nanoemulziók számos hátrányos tulajdonsága abból fakad, hogy a lipid fázist folyékony halmazállapotban tartalmazzák. Lipid nem védi a hatóanyagot a hidrolízissel szemben továbbá a bezárt hatóanyag könnyen kiszivároghat a diszperziós közegbe. A nanotechnológusok szilárd lipidek alkalmazásával orvosolni tudták a nanoemulziók nem kívánatos tulajdonságait.

A kiindulási alapgondolatot az jelentette, hogy a pelleték előállításánál már régóta használtak szilárd lipideket, amelyekkel még a nyújtott hatóanyagleadás is biztosítható volt orális adminisztrációt követően (pl. Mucosolvan[®] Retard Capsules).

Az 1980-as évek elején megjelentek az első porlasztva szárítással fejlesztett szilárd lipid mikrorészecskék. Ebből alakultak ki a nanopelletek, amelyeket úgy készítettek, hogy az olvadt lipidet nagyteljesítményű mixerrel összekeverték, vagy ultrahangot használtak. Ezzel az eljárással relatíve sok mikrorészecske keletkezett, ami perorális adminisztráció során nem okozott problémát, de a nagy részecskeméret szűkítette a felhasználási lehetőségeket, hiszen kizárta például az intravénás alkalmazást.

Az 1990-es évek végére már szubmikronos diszperziókat állítottak elő emulzifikálószer hozzáadásával nagy nyomású homogenizátorral. Ezeket a diszperziókat

hívják szilárd lipid nanorészecskéknek (SLN), amik mérettartományukat tekintve 50-1000 nm-esek és a nanorendszer belső magját nem folyékony, hanem szilárd fázisú lipid adja (Mehnert és Mäder, 2001; Mühlen, 1996). Később jelentek meg a nanostrukturált lipid hordozók (NLC), amelyekben a nagyobb hatóanyag bezárási hatásfok érdekében a belső magot már folyékony olaj és szilárd lipid együttes alkalmazásával állították elő (Iqbal és mtsai, 2012). Az **5. ábra** szemlélteti a lipid tartalmú gyógyszerhordozók szerkezetét és fejlődését.



5. ábra A lipid alapú hordozórendszerek szerkezeti evolúciója
(saját készítésű ábra)

A szilárd lipidmagból álló (SLN, NLC) kolloidális gyógyszerhordozót egy felületaktív anyagokat tartalmazó vizes burok határolja. Rossz vízzoldhatóságú hatóanyagok vizes közegben való diszpergálására alkalmasak, hiszen a hatóanyag a lipid fázisban könnyen elosztható, a felszínét borító felületaktív anyagok - amik főként o/v típusú emulgensek - pedig a vizes fázissal való elegyedést segítik elő. A szilárd lipid mag révén jobban kontrollált a hatóanyag-leadás, valamint a kémiai érzékeny anyagok stabilitása is nő a folyékony lipidekhez képest. Ezek az előnyök összefüggésben vannak a lipid fizikokémiai paramétereivel. Egyrészt a kémiai reaktív anyagok mozgékonyasága szilárd fázisban kisebb, ami így a degradációs folyamatokat korlátozza. Másrészt az aktív komponensek és a lipid mikrofázis szeparációjának köszönhetően az egyes részecskék kontrolláltan helyezkednek el. Ezzel elkerülhető az aktív komponens akkumulációja a lipid felszínén, ahol a kémiai bomlási folyamatok döntően lejátsszódhatnak. Harmadrészt a rosszul abszorbeálódó bioaktív anyagok jobb inkorporációs készséget mutatnak szilárd

lipidben. Továbbá azt is kimutatták, hogy a szilárd lipidek emésztése lassabban megy végbe, mint a folyékonyaké, ez pedig segít a fenntartott hatóanyag-leadásban. Előnyös tulajdonságaik mellett megemlíthető néhány hátrányuk is. A nanorészecskék aggregációra hajlamosak, így a lipid nanorészecskék is. Néhány sajátos nem kívánt viselkedés, a kiszámíthatatlan gélesedési hajlam és a hirtelen fellépő hatóanyag leadás (Mehnert és Mäder, 2001).

1.2.5.4.1. Lipid alapú nanorendszerek előállítása

Kezdetben a lipid nanorendszerek (LN) sok olyan új összetevőt, segédanyagot tartalmaztak, amelyeknek nem volt biztonsági tanúsítványa (Generally Recognized As Safe, GRAS), majd a későbbiekben elfogadottakká váltak. Külsőleges felhasználásra kerülő SLN-ek esetén minden kozmetikai és dermatológiai alapanyag felhasználható, belsőlegesen pedig azok a segédanyagok, amelyek orális adminisztráció esetén tabletták, kapszulák vagy pelletek segédanyagaként már felhasználásra kerültek. A parenterális és a szemészeti felhasználhatóság egy speciális eset, ahol figyelembe kell venni a felületaktív anyagok sejtmembrán károsító hatását adott koncentráció érték felett. A részecskeméretnek kulcsszerepe van a parenterális alkalmazás esetén, az esetlegesen fellépő trombocita aggregáció miatt (Cavalli, 1998).

Az SLN-ek fő szerkezeti elemei a szilárd lipidek, emulzifikánsok, koszolvensek és a víz, míg az NLC esetén ez az olaj komponenssel egészül ki. LN esetén a lipid megnevezést általános értelemben használjuk, amibe különböző szerkezetű hidrofób anyagok tartoznak. Lipideknek tekintjük a triglicerideket, parciális glicerideket, zsírsavakat, kemény zsírokat, szteroidokat és waxokat is. Az emulzifikánsként, koszolvensként felhasználásra kerülhet az összes típusú felületaktív anyag (kationos, anionos, nem-ionos), hogy stabilizálják a lipid diszperziót. Arra a következtetésre jutottak, hogy az emulzifikáns kombinációk hatékonyabban megelőzik a részecskék agglomerációját. Az **5. táblázat** bemutat néhány példát a felhasználható anyagok közül (Yadav és mtsai, 2013).

Az alkalmazott segédanyag meghatározza a termék későbbi tulajdonságait. Magasabb olvadáspontú lipidek felhasználásával a diszpergált fázis viszkozitása is nagyobb lesz ezáltal a homogenizálás során többnyire magasabb olvadáspontú lipidek keletkeznek. Technológiai szempontból kihívást jelent, hogy a lipidek heterogén

szerkezetű vegyületek, amelyeknek egyes paramétereit szállítóként és gyártási tételenként is eltérő lehet. Ilyen tulajdonság a kristályosodási sebesség, de még a lipofilitás is. Ezek a paraméterek hatással vannak például a zéta potenciál értékre, ami befolyásolja a részecskék felületi töltését, borítottságát, ezáltal az agglomerációs hajlamát (LaVan és mtsai, 2003).

5. táblázat SLN-ek fejlesztéséhez felhasznált segédanyagok

	Vegyület típus	Triviális név	Gyári név
Lipid	triglicerid	trimirisztin	<i>Daynasan[®] 11</i>
	kemény zsírok	szilárd zsír	<i>Witepsol[®] W35</i>
	parciális gliceridek	gliceril behenate	<i>Compritol 888 ATO</i>
	waxok	sztearinsav	
Felületaktív anyag	foszfolipidek	szója lecitin	<i>Lipoid S 75</i>
	etilén-oxid kopolimerjei	etilén-oxid	<i>Poloxamer</i>
	szorbitánsav észtrei	poliszorbát 80	<i>Polysorbate 80</i>
	epesók	nátrium taurokolát	
	alkoholok	etanol	

Ahlin és munkatársainak vizsgálata jó példa arra, hogy a lipid összetétele hogyan befolyásolja az átlagos részecskeméretet. Witepsol[®] W35-ből készült SLN-ben az átlagos részecskeméret szignifikánsan kisebbnek bizonyult ($117,0 \pm 1,8$ nm), mint Dynasan[®] 118 ($175,1 \pm 3,5$ nm) használatakor. A különbség annak tudható be, hogy a Witepsol[®] W35 rövidebb zsírsavláncokat és jelentős mennyiségű mono- és diglicerideket tartalmaz, amiknek nagy a felületaktivitási tulajdonságuk (Ahlin és Smid, 1998).

A kiválasztott emulgeálószer is hat az SLN minőségére. Koncentrációjának növelésével csökken a felületi feszültség, valamint elősegíti a részecskék aprózódását a homogenizáció során. Annyi emulgeáló szernek kell lenni a diszperzióban, hogy a homogenizálás során képződött új határfelületet le tudja fedni, ennek hiányában a kialakult nanorendszerek pillanatszerűen aggregálódnak (Müller és mtsai, 2000).

A LN előállítására alkalmazott módszer is hatással van a termék minőségi tulajdonságára. LN-ek formulálására az alábbi technikák alkalmasak:

- Nagy nyomású homogenizálás (HPH), ami lehet hideg vagy meleg
- Ultrasonikálás, ami lehet szondás vagy kádas
- Oldószer elpárologtatás
- Oldószer emulziós-diffúziós módszer
- Szuperkritikus folyadék módszer
- Mikroemulziós módszer
- Dupla emulziós módszer
- Csapadékképződésen alapuló technika
- Film-ultrahang diszperziós módszer
- Oldószer injekciós technika
- Membrán érintkeztetésen alapuló technika

A továbbiakban részletesen ismertetek néhány módszert, amivel a leggyakrabban formulálnak SLN-eket és NLC-ket.

1.2.5.4.1.1. Szilárd lipid nanorendszer formulálása HPH-val

Elsőként az igen megbízható és termelékeny technikával, a nagy nyomású homogenizálással állítottak elő SLN-eket. Két különböző típusát különböztetjük meg, a meleg és a hideg homogenizálást. Mindkét típusnál az olvadt lipidben oldják vagy diszpergálják a hatóanyagot a preparáció során.

Meleg homogenizálás során a homogenizáció a lipid olvadáspontja felett történik, ennél fogva ugyanolyan, mintha egy emulzió homogenizációja menne végbe. A nagy nyomású homogenizálás előtt a preemulziót Ultra-Turrax (nagyteljesítményű mixer) segítségével előhomogenizálják, így egy mikroemulziót készítve. A magasabb hőmérséklet alkalmazása csökkenti a rendszer viszkozitását, és ezáltal kisebb részecskeméretet eredményez. Ugyanakkor a hatóanyag bomlási folyamatai is felgyorsulhatnak. Meg kell említeni, hogy a HPH során a minta hőmérséklete emelkedik 500 bar-onként körülbelül 10 °C-ot. A homogenizálás során alkalmazott ciklusok számának túlzott növelése már nem csökkenti, hanem a növeli a részecskék átlagos méretét, a diszperz rész nagy kinetikus energiája miatt beinduló koaleszcencia miatt. A

képződött nanoemulzió szobahőmérsékletre hűtésével képződik a szilárd nanorészecske, amely a hatóanyagot a lipid magokban tartalmazza (Mishra és *mtsai*, 2010; Müller és *mtsai*, 2000). Nazemiyeh és kollégáinak ezzel a módszerrel 125 nm körüli likopinnal töltött SLN-eket sikerült előállítani, aminek a bezárási hatásfoka több mint 98% volt az optimált összetétel esetén (Nazemiyeh és *mtsai*, 2016).

Hideg homogenizálás esetén a lipidek szilárd halmazállapotban kerülnek prehomogenizálásra, így nem egy emulziót, hanem egy szuszpenziót képeznek elsődlegesen. A cél az volt, hogy a hőérzékeny hatóanyagokból is lehessen így SLN-eket előállítani és a lipidek magas hőmérsékleten történő átkristályosodását elkerülhessék. Általában a lipid olvadáspontja fölött 5-10 °C-kal történik a hatóanyag diszpergálása a lipid fázisban, majd gyors hűtéssel, például száraz jeget tartalmazó fürdőbe helyezéssel megszilárdítják a lipid mátrixot. A hideg törékennyé teszi a lipidet, ami kedvez a részecskék aprózódásának. Ezek után őrléssel mikrorészecskéket (50-100 µm) hoznak létre, majd emulzifikálószer oldatának hozzáadásával preszuszenzió jön létre, amely HPH során SLN-eket képez. Általánosságban azonban elmondható, hogy hideg homogenizációval nagyobb részecskék, valamint heterodiszperzebb rendszer keletkezik (Dingler és Gohla, 2002).

1.2.5.4.1.2. Szilárd lipid nanorendszer formulálása ultraszonikálással

Ultraszonikálás során magas sebességű homogenizálással úgy gyárthatók nanorészecskék, hogy a diszperziós közegnek nagy mennyiségű emulgenst kell tartalmaznia. Sajnos az így képződő lipid nanorészecskék méreteloszlása igen széles (Kurakula és *mtsai*, 2016).

1.2.5.4.1.3. Szilárd lipid nanorendszer formulálása oldószer elpárologtatással

A technika első lépéseként feloldják a lipid fázist egy vízzel nem elegyedő szerves oldószerrel (ilyen például a ciklohexán), majd nagy nyomású homogenizálás után vákuum bepárlással távolítják el a szerves oldószert, ezek után képződnek a 25 nm átlagos részecskeméretű LN-ek (Soni és *mtsai*, 2016).

1.2.5.4.1.4. Szilárd lipid nanorendszer formulálása mikroemulziós módszerrel

A mikroemulziós módszer alapját a mikroemulziók hígítása képezi. Alacsony olvadáspontú lipideket a 65-70 °C hőmérsékleten, keverés mellett a felületaktív anyagot tartalmazó vizes fázishoz adunk, majd a forró mikroemulziót hideg vízben eldiszpergáljuk 1:25 vagy 1:50 arányban. Tehát egy rész mikroemulzióhoz szükséges minimum 25 rész 2-3 °C-os hideg víz. Nagy energia befektetése nélkül lehet ezzel a technikával elérni a szubmikronos mérettartományt (Kumar és Sinha, 2014).

1.2.5.4.2. Lipid alapú nanorendszerek felhasználásának lehetőségei

A lipid alapú gyógyszerhordozó rendszereket számos gyógyszerformában alkalmazzák, a már említett előnyös tulajdonságaik miatt.

Orális felhasználásuk történhet diszperziós folyadék formájában, vagy hagyományos orális készítmények (tabletta, pellet, kapszula) részeként. Champtothecin tartalmú SLN szuszpenzió vérszint görbáját hasonlították össze az oldatével. Azt tapasztalták, hogy a poloxamer bevonatú SLN adminisztrációja esetén két maximuma volt a görbének az egyik a beadást követően hamar jelentkezett, ami a szabad hatóanyag felszabadulásának lehet az oka, míg a második görbe 3 órával később, ami a SLN formuláció nyújtott hatásának volt köszönhető. Továbbá a vérszint görbe alatti terület ($AUC_{0-\infty}$) értéke magasabb értéket mutatott az oldathoz képest, ami pedig annak köszönhető, hogy a hatóanyag hidrolízisét gátolta a LN forma (Yang és mtsai, 1999).

Parenterális alkalmazásra is felhasználhatóak akár intravénásan akár intraartikulárisan is. A hagyományos szuszpenziós készítményekhez képest kevesebb irritációval kell számolni. Doxorubicin-SLN formulációval magasabb hatóanyag koncentráció érhető el a tüdőben, lépben és az agyban. A hagyományos oldat a májban és vesében dúsul fel, az előbbiben hamar metabolizálódik, az utóbbiban pedig kiürül a szervezetből (Fundaro és mtsai, 2000).

Közvetlen transzdermális felhasználása az alacsony lipid fázis tartalom miatt korlátozott, ezért szükséges gél vagy kenőcs alapba inkorporálni. Maga az SLN vagy NLC nem toxikus, irritációt nem okozó lipidekből épül fel, ezért topikális alkalmazása problémamentes, akár gyulladt és hámsérüléssel szöveteken is alkalmazható. Számos

hatóanyagból (clotrimazole, podophyllotoxin, antiandrogén, E vitamin) állítottak már elő dermális lipid nanorészecskéket (Chen H. és *mtsai*, 2006; Dingler és *mtsai*, 1999; Munster és *mtsai*, 2005; Souto és *mtsai*, 2004).

Szemészeti felhasználásuk előnye a nyújtott hatóanyagleadás a látás károsítása nélkül. Mucoadhezív tulajdonsága révén hosszan tartó hatást tud kifejteni a lipid nanorészecskébe zárt gyógyszermolekula, növelve annak biohasznosulását. Cavalli és munkatársai paclitaxel és tobramycin hatóanyag esetén is ezt tapasztalták (Cavalli és *mtsai*, 2000; Cavalli és *mtsai*, 2002). Hippalgaonkar és munkatársai a ciklodextrin és az SLN alapú indometacin tartalmú oldatokat hasonlította össze. Azt tapasztalták, hogy a kémiai stabilitás és a cornea permeabilitás értéke a lipid formuláció esetén magasabb értéket mutatott (Hippalgaonkar és *mtsai*, 2013).

Három különböző ofloxacin tartalmú szemcsepp (hagyományos, NLC alapú és kitozánnal borított NLC alapú) nyúl cornea permeációs vizsgálata során megállapították, hogy a kitozán csökkenti a permeációt, míg a hagyományos és az NLC alapú között nincs szignifikáns különbség. A cornea szövetbe történő penetráció viszont magasabb értéket mutatott a bevonat nélküli NLC gyógyszerforma esetén (Ustundag-Okur és *mtsai*, 2014).

Az LN-ek pulmonális alkalmazása igen ígéretes. Alacsony részecskeméretük miatt csak aerosollal kerülhetnek felhasználásra, hiszen a beteg az inhaláció után közvetlenül kilélegezné. Fontos azonban, hogy az aerosol formulálása során ne aggregálódjanak a részecskék. Az alveolusokba jutott hatóanyag a lipid nanorészecskéből szabályozott módon tud felszabadulni, elkerülve a first-pass metabolizmust. A hatóanyag felszívódás a tüdő nagy felületéről könnyen megvalósítható, akár daganatos megbetegedések esetén is. A nyirokkeringést kihasználva egyes hatóanyagok biohasznosulása fokozható ezzel a gyógyszerformával. Pandey és kollégái igazolták ezt a feltételezést. Tuberkulózissal fertőzött tengerimalacokat kezeltek antituberkulotikum tartalmú SLN-ekkel, és mérték a plazma szintet illetve az egyes szervek hatóanyagtartalmát. Továbbá vizsgálták a tuberkulózis baktérium jelenlétét. LN alapú készítmény esetén 7 napos pulmonális kezelés követően a baktérium már nem volt kimutatható, hasonló eredményt orális alkalmazással 46 nap kezelés után tudtak csak elérni (Pandey és Khuller, 2005).

2. Célkitűzés

A hatóanyagok feloldása a szervezet vizeitében kulcsfontosságú a gyógyszerhatás kialakulásának szempontjából, ezért is jelent kihívást a gyógyszertechnológusok számára a rossz vízoldhatóságú hatóanyagokból potens gyógyszerkészítmény formulálása. Gyakran a hagyományos oldhatóságnövelési eljárások nem elégségesek vagy nem lehetségesek. Ez a hajtóereje annak, hogy folyamatos kutatás folyik új formulációs utak és segédanyagok keresésére. A segédanyagok közül kiemelkedő szerepet töltenek be a vendégmolekula befogadására képes ciklodextrinek. Ezek az oligoszacharidok képesek orvosolni a hatóanyag oldhatatlanságából adódó problémákat, de sajnos nem teljesen mellékhatás mentesek, így nem minden esetben lehetséges alkalmazásuk. A ciklodextrinek mellett a modernkori gyógyszerészeti nanotechnológia jelent ígéretes alternatívát a hatóanyagok oldódási nehézségeire.

A nanotechnológia létjogosultsága az oldhatóságnövelő eljárások között abban rejlik, hogy a részecskeméret csökkentés kulcs szerepet játszik az aktív felület kialakításában, amely így elősegíti az oldódás folyamatát. A nanoméretű gyógyszerhordozó rendszer kialakítása során igyekeznek úgy kialakítani maximális határfelületértéket, hogy közben biokompatibilis segédanyagokat alkalmaznak. Biokompatibilis segédanyagokra jó példa az irodalmi áttekintésben ismertetett albumin és lipid alapú nanohordozók.

Doktori munkám során célul tűztem ki, hogy egy rossz vízoldhatóságú antifungális szerből olyan nanorendszert formuláljak, amely alapját képezheti egy folyékony gyógyszerforma kifejlesztésének. A választott modell hatóanyagom a vorikonazol, egy triazol származék, amelyet az egyre gyakoribb szisztémás és topikális gombás fertőzések kezelésére alkalmaznak. A forgalomban lévő vorikonazol tartalmú intravénás készítményben a farmakon megfelelő oldhatóságát ciklodextrin alkalmazásával valósították meg. Az ciklodextrin hátránya, hogy ellenjavallt a használata beszűkült vesefunkció esetén (Hafner és *mtsai*, 2010). Kutatómunkám fontos célja volt, hogy olyan nanorendszert állítsak elő, amely a humán szervezet által jól tolerálható segédanyagokból épül fel, ne kelljen a segédanyagok okozta mellékhatásokkal számolni

és a klinikum számára elérhető gyógyszerkincset gyarapíthassam alapkutatásaim eredményével.

Kísérletes munkám során célul tűztem ki:

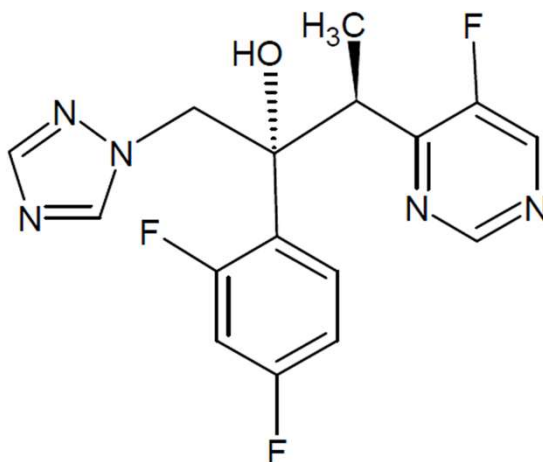
- 1) Albumin és lipid alapú modern nanorendszerek fejlesztését nagy nyomású homogenizátor segítségével, amelyek alkalmasak lehetnek a rossz vízoldhatóságú hatóanyag, a vorikonazol hordozására.
- 2) A nanorendszerek előállítására használt nagy nyomású homogenizátor paramétereinek meghatározását és optimalizálását az adott nanorendszerre.
- 3) A fejlesztett nanohordozó rendszereket a harmadik generációs antimikotikus hatású vorikonazolra optimalni.
- 4) Vorikonazol tartalmú nanorészecskék karakterizálását az alábbiak szerint:
 - részecskeméret
 - részecskeméret-eloszlás
 - bezárási hatásfok
- 5) Az optimalizált vorikonazol tartalmú nanorendszer további vizsgálatát úgy, mint:
 - *in vitro* hatóanyagleadási képesség
 - differenciális szkenning kalorimetriás vizsgálat
 - infravörös spektroszkópia vizsgálat
- 6) Meghatározni, hogy várhatóan melyik nanorendszer alkalmas arra, hogy egy új folyékony gyógyszerforma fejlesztésének az alapját képezze.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Felhasznált anyagok és fő tulajdonságaik

3.1.1. Vorikonazol, mint hatóanyag

A vorikonazol az azol típusú vegyületek csoportjába tartozik, azon belül is a triazolokhoz mert a heterociklusos gyűrűs molekula öttagú oldalláncában három nitrogén atom található (6. ábra).



6. ábra Vorikonazol: (2R,3S)-2-(2,4-difluorofenil)-3-(5-fluoropirimidin-4-il)-1-(1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ol (saját készítésű ábra)

A vorikonazol (Mt.: 349,31 g/mol) fehér por, amit a kínai BrightGene Bio-Medical Technology Co. Ltd cégtől szereztünk be, tisztasága 99,8%-os. A hatóanyag hevítés hatására 127-130 °C-on olvad meg. Vízoldhatósága alacsony (0,0978 mg/ml), alkoholban, kloroformban és acetonitrilben jól oldódik. Gyenge bázikus karakterrel rendelkezik pKa értékei: 4,98 és 12. A BCS osztályozási rendszerben a második csoportba sorolható rossz vízoldhatósága és jó permeabilitása miatt.

A szisztémás gombás fertőzések száma évről évre nő azáltal, hogy nő az immunsupresszált betegek száma (elhúzódó szteroidos kezelések, transzplantáció, HIV fertőzöttség terjedése). Ezért van szükség újabb és újabb széles hatásspektrumú antimikotikus hatóanyagok szintézisére, mint amilyen a vorikonazol maga is (Scorzoni és mtsai, 2016; Svetaz és mtsai, 2016). A gombák P-450 enziméhez kötődve gátolja az ergoszterol szintézisét, ami létfontosságú eleme az ép sejtmámbrán felépítésének. A

VCZ-t leggyakrabban flukonazol rezisztens aspergillosis, candidiasis és keratomikózis esetén alkalmaznak (Sanati és mtsai, 1997; Sheehan és mtsai, 1999).

A plazmafehérje kötődése 58%-os és N-oxid metabolittá alakul a májban, aminek már alacsony az anitfungális hatása. A hatóanyag 2%-ka változatlan formában ürül ki a vizelettel.

Magyarországon is Vfend® néven került először forgalomba. Az elérhető gyógyszerforma jelenleg a 10 illetve 20 mg/ml-es koncentrációjú injekció mellett az 50 mg-os filmtabletta.

3.1.2. Reagensok és törzsoldatok

3.1.2.1. Nab® technológia fejlesztéséhez felhasznált reagensok

A formuláláshoz szükséges humán szérumbalbumint a 20%-os HSA infúzió Milli-Q vízzel történő hígításával kaptuk, az infúziót az Octapharmától (Budapest, Magyarország) szereztük be. A PBS-t, kloroformot az izooktanolt az acetonitrilt mind analitikai minőségben vásároltam meg a Sigma Aldrich-től (Budapest, Magyarország) úgy, mint a dializáláshoz használt cellulóz membránt (D9277) is. Minden kísérlet során deionizált, ultrafiltrált vizet használtam (Milli-Q System, Millipore, Budapest, Magyarország). A részecskeméret meghatározásához szükséges küvetákat a Malvern Instruments Ltd-től (Budapest, Magyarország) szereztük be.

3.1.2.2. Lipid nanorészecske formulálásához felhasznált reagensok

A PBS-t, L- α -Foszfatidilkolin-t (PPC) a dialízis membrán (D9277; cellulóz-acetát, 10 kDa) a Sigma Aldrich-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk meg. A Compritol® 888 ATO (glyceril behenat) mintaként kaptuk Gattefossè (Lyon, Franciaország). Az etanol 96%, Witpsol® W35, polysorbate 80 és a sztearinsav a Molar Chemical Ltd-től származik (Budapest, Magyarország). Szintén ultrafiltrált vizet használtam minden vizsgálathoz. Az Amicon® Ultracentrifuga (30 kDa) regenerált cellulóz membrán szűrőt a Millipore-től vásároltam meg (Millipore Ireland Ltd, Dublin, Írország).

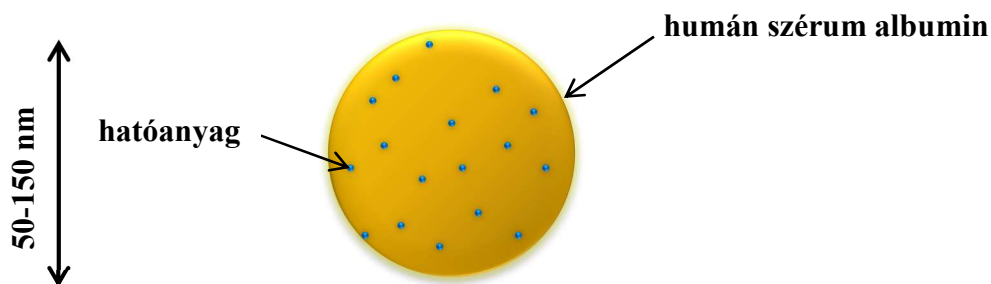
3.2. A felhasznált módszerek

3.2.1. *Vorikonazol tartalmú albumin nanorészecske formulálása*

3.2.1.1. Nab[®] technológia bemutatása

A Nab[®] technológiával az alábbi lépésekkel lehet előállítani albumin nanorészecskéket:

1. Első lépésként választanunk kell egy megfelelő szerves oldószert, amiben a hatóanyag jól oldódik, és előnyös, ha vízzel nem elegyedik
2. A következő lépésben humán szérumból albuminból vizes oldatot kell készítenünk úgy, hogy az irodalmi ajánlásnak megfelelően az elkészített oldat albumin koncentrációja 0,5-5% közötti legyen
3. A szerves fázis és a fehérjeoldat elegyítését követően nagy nyíróerők kifejtésére alkalmas eszköz segítségével (pl. nagy nyomású homogenizátor) homogenizáljuk. A művelet eredményeképpen egy stabil nanoemulziót kapunk, amely elkészítéséhez nem volt szükségünk emulgens használatára, ugyanis az albumin amfipatikus tulajdonságának köszönhetően képes volt ezt a szerepet betölteni.
4. A nanoemulzióból ezután a szerves oldószert el kell távolítanunk. Alkalmas módszer az eltávolításra a rotációs vákuumbepárlás, porlasztva szárítás, vagy a fagyasztva szárítás is. Ezután egy szerves oldószertől mentes diszperziót kapunk, ahol a hatóanyag fehérjeburokban található (**7. ábra**).
5. Ha szükséges, akkor a steril szűrést 0,20 µm pórusátmérőjű membránszűrővel valósíthatjuk meg.
6. Ha növelni akarjuk a nanodiszperz rendszer stabilitását, akkor liofilizálással eltávolíthatjuk a vizet a rendszerből. Krioprotektáns alkalmazása sem kell hozzá, mert az albumin ezt a szerepet is betölti. Végül egy liofilizált porhoz jutunk, amit könnyen tárolhatunk, és használata előtt vízben, fiziológiás sóoldatban, aminosavak oldatában, stb. rediszpergálható (Chen W. és mtsai, 2008).



7. ábra Hatóanyag- humán szérum albumin nanokomplexe (saját készítésű ábra)

A következőkben részletesen ismertetem a Nab[®] technológia 3 fő lépését:

1. lépés: oldatkészítés
2. lépés: homogenizálás
3. lépés: szerves oldószer eltávolítása

3.2.1.2. A kiindulási elegy elkészítése

A képződő nanorészecske tulajdonságait befolyásolja a szerves oldószer minősége és mennyisége, az albumin oldat koncentrációja és a két fázis aránya, ezért az oldatkészítés során ezeket a paramétereket változtattam az adott határértékek között (Chen W. és mtsai, 2008).

Különböző analitikai pontossággal mért hatóanyag mennyiséget (10, 15, 20, 50 mg) oldottam 1 ml szerves oldószerben (kloroform, izooktanol). A HSA-ból 2 és 3%-os oldatokat készítettem vízzel. Ezt követően a szerves oldószeres fázist elegyítettem a HSA vizes fáziséval különböző arányban (1:10; 1:15), majd Homorex (Brogli & Co. AG., Bazel, Svájc) keverő segítségével 3 percen keresztül 80 rpm-mel előhomogenizáltam.

3.2.1.3. Nagy nyomású homogenizálás

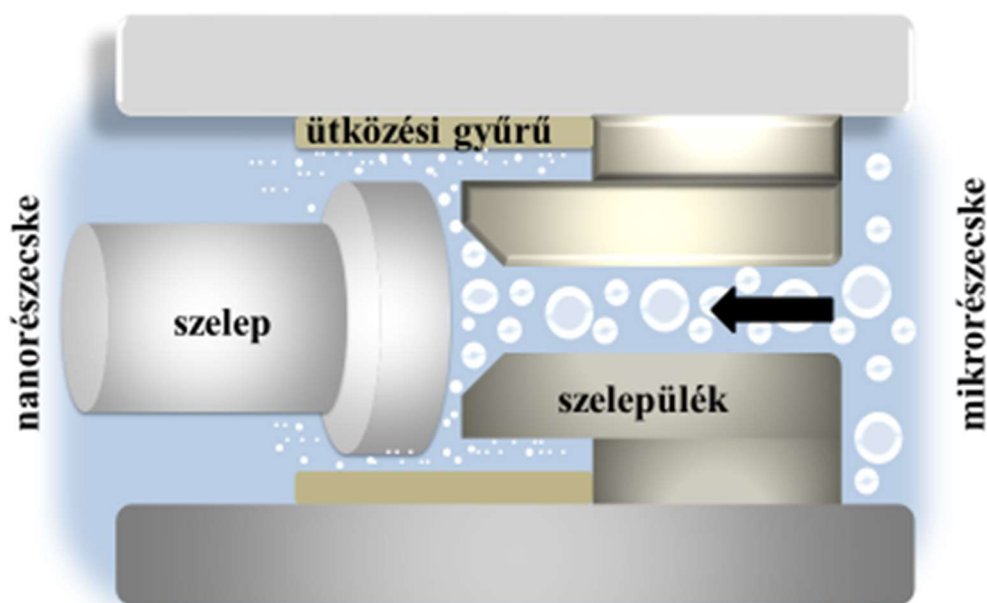
Avestin Emulsiflex B15 (Avestin Ltd., Mannheim, Németország) típusú nagy nyomású homogenizátorral végeztem el a nanorendszer formulálását. Az elkészített emulziót nagy nyíróerőnek kell kitenni, amit a homogenizátorral lehet biztosítani.

Ezen technológiai lépés során meghatározóak a következő paraméterek:

- homogenizálási nyomás
- homogenizálási ciklusok száma.

Ez a technológia az úgynevezett leépítő (top down) eljárások közé tartozik (Kovács-Kiss, 2010). Miután mindkét nanorendszer formulálásához HPH-át használtam, ezért részletesen ismertetném az eljárás főbb paramétereit és sajátosságait. A módszer során a mintát nagy nyomással juttattam keresztül egy szabályozható nyílású szelepen. A nagynyomású homogenizátor egy a nagy nyomás biztosító búvárdugattyúból és az ezt követő könnyítő szelepből áll. Fontos része az eszköznek a homogenizáló szelep, ami egy rögzített szeleplésből és az állítható szelepből áll. A két eszköz egy szabályozható precíziós radiális rést alkot. A mintára ható tényleges homogenizálási nyomás, a részkondíciók és az ellenállás így a szelep segítségével állítható. A szelepre ható nagy nyomás okozta terhelés csökkentése miatt szükség van egy ütközési gyűrűre, ami megakadályozza a szelepburkolat áramlás hatására bekövetkező károsodását. A szűkületben a minta extrém módon felgyorsul a nagy nyomáskülönbség miatt. A potenciális nagy nyomás energiája átalakul kinetikus energiává, csökkenést okozva a statikus nyomásban. A nyomás elérheti a víz gőznyomását, ezáltal gőzbuborékok keletkeznek a mintában. Amikor a szűkületet elhagyja a minta a nyomás hirtelen csökken és szétdurrannak a gőzbuborékok. Ez a folyamat indukál egy nagy energiájú lökés hullámot. A minta elemeit erős mechanikai hatások érik (kavitáció, nyírás, ütközés), ezért csökken a részecskeméret. A folyamat hatásossága számos a **6. táblázatban** felsorolt tényező változtatásával fokozható, de ennek határt szab az anyag kristályszerkezetének esetleges megváltozása, illetve az amorf frakció arányának növekedése. Ez utóbbi stabilitási problémákkal járhat (Jahnke, 1998). A homogenizátor szerkezeti felépítését a **8. ábra** szemlélteti.

Az egyszerűnek tűnő alapelv ellenére, a HPH során a mintára komplex hidrodinamikai és mechanikai erők hatnak, amelyek tulajdonképpen összeűzzák a részecskéket. Ez a meglehetősen összetett folyamat a homogenizáló szeleprésben zajlik, amit számos paraméter együttes hatása befolyásol. Amennyiben néhány fontos korreláló tényezőt konzekvensen figyelembe veszünk a technológiai folyamat során, a homogenizátorok teljes kapacitásskálája optimálisan hasznosíthatóvá válik.



8. ábra A nagy nyomású homogenizátor szerkezeti felépítése (saját készítésű ábra)

6. táblázat A részecskeméretet befolyásoló paraméterek a HPH során (Jahnke, 1998)

Fizikai paraméterek	Homogenizációs szelep paraméterek	Folyamat paraméterek
fázisok viszkozitása	effektív átmérő	homogenizációs nyomás
fázisok sűrűsége	beömlőnyílás sugara	ellennyomás
határfelületi feszültség	csapágyszelep hossz	hőmérséklet
emulgens koncentráció	résmagasság	kapacitás
emulgens felületi fedésének kinetikája	hatástávolság	nyomásszint száma
emulgens fedési sűrűsége		homogenizálási ciklusszám
a diszperz fázis keményégi foka		
a diszperz fázis koncentrációja		
folytonos fázis gőznyomása		
kezdeti részecskeméret		
oldott/oldatlan gáztartalom		

A részecskeméretet befolyásoló tényezőket alapvetően három csoportba sorolhatjuk, az átláthatóság kedvéért táblázatos formában ismertetem ezeket (**6. táblázat**).

A részecskeméret mellett rendkívül fontos paraméter a diszperzió méreteloszlása, amit a formuláció összetételének változtatásával vagy a HPH paramétereinek beállításával kontrolálhatunk. Az emulgensek koncentrációja és típusa is fontos nem csak a két fázis aránya, továbbá hatása lehet minden egyes segédanyagnak, hatóanyagnak is. A HPH során a gyártási paraméterek közül a hőmérséklet, az alkalmazott nyomás és homogenizálási ciklusok száma befolyásolja legjobban a keletkezett termék méreteloszlás értékét (Jahnke, 1998).

Gyógyszerészeti felhasználás szempontjából fontos, hogy a nagy nyomású homogenizátor a terméket megfelelő minőséggel, megbízhatósággal és mikrobiológiai tisztasággal állítsa elő. Ehhez kritikus előfeltétel, hogy a termékkel érintkező alkatrészek tisztíthatók, és aszeptikus körülmények között fertőtleníthetők legyenek. A berendezés a lehető legkevesebb holtterrel rendelkezzen, ne legyenek benne éles sarkok, és minimális legyen a benne alkalmazott tömítések száma. Alkalmazható legyen benne megfelelő nyomásmérő berendezés, továbbá a folyamatellenőrzés minden részében megvalósítható legyen. A készülékben a minta a lehető legkisebb felülettel érintkezzen, és ennek anyaga ellenálló legyen. Tartalmaznia kell egy aszeptikus gátat, ami megakadályozza a külső környezettel való kontaminációt. A nagy nyomású homogenizátor megfelel ezeknek a követelményeknek, és megvalósítható vele a nagyüzemű gyógyszergyártás is.

3.2.1.4. A szerves oldószer eltávolítása

A homogenizálás során kialakult a hatóanyagot körülvevő albumin alapú nanohordozó rendszer. Az oldatkészítések során felhasznált szerves fázis alapvetően nem kívánatos a rendszerben. A szerves oldószer eltávolításának megvalósítására több lehetőség is rendelkezésre áll. Három technológiát is kipróbáltam a fejlesztés során, amelyek a következők:

1. nitrogén gázzal történő bepárlás
2. rotációs vákuumbepárlás
3. liofilizálás

Az alábbiakban ezen módszereket ismertetem részletesen a rájuk vonatkozó előnyeikkel és hátrányaikkal.

3.2.1.4.1. Nitrogén bepárlás

Oxigénre érzékeny anyagok esetén szükséges lehet annak kizárása. Erre jó megoldást jelent a nitrogén gázzal történő bepárlás. A töményítés ebben az esetben történhet egyenes vagy forgó gázárammal. A legegyszerűbb eljárás, amikor egy Pasteur-pipettán keresztül nitrogént fúvatunk egy mintásüvegben vagy kémcsőben lévő oldat fölé mindaddig, amíg az a kívánt térfogatra bepárlódik. Ezt a módszert gyakran alkalmazzák liposzómák előállítására is (Kaszás és mtsai, 2013). Forgó gázáramot alkalmazó rendszer az atmoszférikus nyomáson működő „turbovap” berendezés. A nitrogént ebben az esetben tangenciális irányban vezetik be, és a betöményedett oldat a készülék falán lecsorogva egy keskeny, hűtött mintatartóba, kémcsőbe gyűlik össze. A maximális hatékonyság elérése érdekében a nitrogén gázáramot rendkívül pontosan kell pozícionálni, és fontos, hogy sebessége precízen beállítható legyen (Komarek, 1967). A munkám során használt nitrogén bepárló berendezés Zymarc TurboVap EV Evaporator (**9. ábra**) volt. A 0,5 ml mintát 37 °C-on termosztálva 8 órán keresztül pároltam be ezzel a módszerrel.



9. ábra Zymarc TurboVap EV Evaporator típusú nitrogén bepárló (saját készítésű fotó)

3.2.1.4.2. Rotációs vákuumbepárló

A rotációs vákuumbepárlás során emelt hőmérsékleten csökkentett nyomáson történik az oldószer bepárlása, amely majd vékony filmként eloszlik az edény belső falán. Az alacsony nyomás következtében csökken az oldatban lévő folyékony komponensek forráspontja, ezért a rotációs vákuumbepárló használata lehetővé teszi az oldószer eltávolítását anélkül, hogy nagymértékű hőmérsékletnövelés alkalmazására lenne szükség. A legtöbb rotációs vákuumbepárló négy fő részből áll: a meleg fürdőből, a rotorból, a kondenzátorból és az oldószer csapdából. Szükséges továbbá egy szívókészülék, vagy vákuumszivattyú csatlakoztatása, valamint egy olyan, a mintát tartalmazó kerek aljú lombik felszerelése, amiben a minta bepárolható (Carl, 2010). A formulálás során alkalmazott minták szerves:vizes fázisarányát (pl.: 1:15) használva 15 ml mintát helyeztem a rotációs vákuumbepárlóba. Azért, hogy jobban látható legyen a két fázis viselkedése 0,1 ml R-timolkék oldattal festettem meg a vizes fázist.

3.2.1.4.3. Liofilizálás

A liofilizálás nem más, mint fagyasztva szárítás. A mintákat a lefagyasztás után vákuumban, szublimáltatással szárítjuk. Számos előnye van, mint például, hogy a termolabilis anyagok csak minimális változást és aktivitás-csökkenést szenvednek el, porózus, könnyen összetörhető szerkezet keletkezik, ami biztosíthatja a gyors és teljes rehidratációt. A minták lefagyasztása során fontos paraméter a liofilizálás sebessége és a hőmérséklet. Nyugvó rétegen fenék és ferdefagyasztás, mozgatott rétegen kéregfagyasztás végezhető. A rétegvastagság sík fűtőtálca esetén 5-10 nm, speciális fűtőtömbök furatai esetén pedig 50-80 mm. A gyors hűtés a kristálygócok kialakulásának kedvez, a lassú hűtés a kristályok növekedését segíti elő. A látens hő pótlásáról, és a legfontosabb üzemi paraméterek ellenőrzéséről gondoskodni kell, valamint a párolgás okozta hőveszteséget is pótolni kell, hogy a minta hőmérséklete ne érje el az eutektikus hőmérsékletet. A liofilizálás során ellenőrzik a tálcák, a kondenzátor és a minták hőmérsékletét, és a munkatér vákuum-értékét is (Goshima és mtsai, 2016).

A 2 ml 1 órán át $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on előfagyasztott mintákat 24 órán át $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os tálcafűtés mellett ScanVac Coolsafe TM (10. ábra) típusú készülékkel sikerült teljesen bepárolni. A módszer alkalmas volt arra, hogy reprodukálható módon lehessen vele nagy számú minta szerves oldószerének az elpárolgotatását elvégezni, ezért a továbbiakban ezzel a technikával kezeltük a mintákat.



10. ábra A liofilizáláshoz használt ScanVac Coolsafe TM készülék (saját készítésű fotó)

3.2.2. *Vorikonazol tartalmú SLN formulálásához felhasznált módszerek*

Az irodalmi eredmények szerint több típusú emulgens együttes alkalmazása hatékonyan akadályozza meg a részecske aggregációt, mint egy emulgens. Ezért az **5. táblázat**ban ismertetett felületaktív tulajdonságú anyagok közül 3 fajtát választottam. Célunk az volt, hogy a felületaktív anyag koncentrációja a végtermékben ne korlátozza annak felhasználási területét, így alkalmas legyen akár parenterális, vagy szemészeti készítmény alapjául szolgálni. Ez a két alkalmazási forma a legérzékenyebb a felületaktív anyagok koncentrációjára, az előbbinél hemodialízis az utóbbinál cornea irritáció léphet fel (Maurer és mtsai, 1998; Zhang S. és mtsai, 2010).

A foszfatidilkolin 0,03 g-os mennyiségét oldottam etanol (0,5 g) koszolvens segítségével, majd hozzáadtam 0,0075 g poliszorbát 80-at. Így az összes emulgens és koszolvens mennyisége a mintában csak 2,68%-ék volt. A preemulzió elkészítéséhez a választott lipideket (sztearinsav, Witepsol® W35, Compritol 888 ATO) megolvasztottam. A végső lipid típust a részecskeméret és eloszlás meghatározása után választottam ki. Az olvadt lipid mennyiségéhez (0,25, 0,50, 0,75 g), ami összhangban van az irodalomban használt mennyiséggel (1-10%), hozzáadtam a vorikonazol (50, 100, 150 mg) mennyiségét. Ezután a felületaktív anyagot tartalmazó etanol oldatot öntöttem hozzá, majd állandó keverés mellett kis részletekben az azonos hőmérsékletű 20 ml deionizált vizet. A képződő emulziót Ultra-Turrax homogenizáló (IKA® Works Inc., Németország) segítségével 3 percen keresztül 20,000 rpm-mel homogenizáltuk.

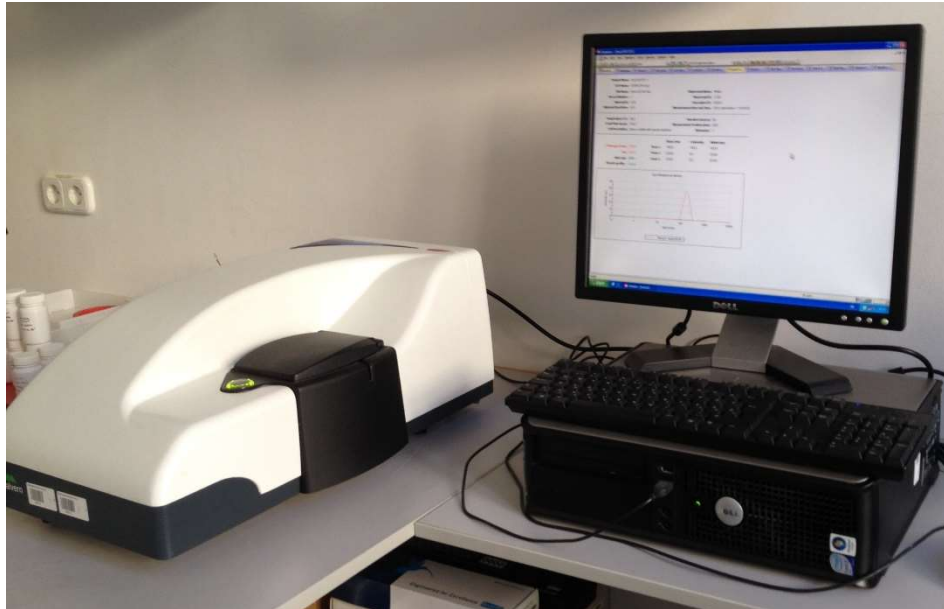
A nanorészecskék kialakítását 600 bar nyomáson végeztem el a már leírt nagy nyomású homogenizátor (Avestin Emulsiflex B15 készülék, Avestin Europa GmbH, Mannheim, Németország) segítségével. A homogenizálási ciklusok számának (3-5) hatását vizsgáltam a képződött nanorészecskék méreteloszlására.

3.2.3. *Az albumin nanorészecskék karakterizálására használt módszerek*

3.2.3.1. Az albumin nanorészecskék méretének meghatározása

A nanorészecskék legkritikusabb paramétere a részecskék mérete és azok eloszlása. A méréseket Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Dublin, Írország) (**11.ábra**) készüléken végeztem el. A liofilizált mintákat újra feloldottam 2,5 ml MilliQ vízben,

majd 0,2 μm pórusátmérőjű cellulóz-acetát fecskendőszűrő (Sartorius, Goettingen, Németország) segítségével szűrtem.



11. ábra Részecskeméret meghatározó
(Malvern Zetasizer Nano ZS, saját készítésű fotó)

A szűrlet 100 μl -ét 10-szeresére hígítottam MilliQ vízzel, a hígított mintát üveg küvettába (PCS115) töltöttem, és azonnal mértem. A beállított paraméterek a mérés során a következők voltak:

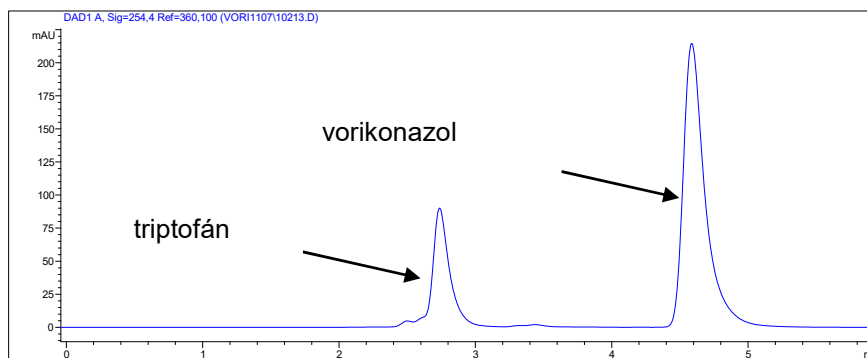
- anyag: fehérje
- a refraktív index: 1,450
- a diszperziós közeg: víz
- a mérés hőmérséklete: 25 °C
- ekvibrációs idő (equilibration time): 120 másodperc

3.2.3.2. Az albumin nanorészecskék hatása a vorikonazol oldhatóságára

A vorikonazol koncentrációját egy HPLC-UV módszer segítségével határoztam meg. A liofilizált mintákat rehidratálás után 0,2 μm pórusátmérőjű cellulóz-acetát (Sartorius, Goettingen, Németország) fecskendőszűrő segítségével szűrtem. A szűréssel eltávolítható az esetlegesen kivált hatóanyag mennyisége. A HPLC-vel történő detektálás

előtt szükség volt a minta fehérje mentesítésére. Acetonitril (ACN) 1:1 arányban történő hozzáadásával kicsaptam a HSA-t. A leszűrt mintákból 200 µl-t automata pipettával Eppendorf csőbe mértem, majd ehhez 200 µl ACN-t pipettáztam, ezek után 15 percre ultrahang fürdőbe helyeztem. A kicsapást követő ultrahang fürdő segítségével extraháltam a hatóanyag teljes mennyiségét. A mintákat ezután centrifugáltam 15 percig 14000 g-vel MiniSpin Plus (Eppendorf AG, Hamburg, Németország) típusú készülékben, és az elkülönülő felülúszóból, az oldat tisztájából 200 µl-t HPLC mintatartóba helyeztem.

A használt HPLC módszer alkalmas arra, hogy a HSA infúzióban jelenlévő, stabilizáló szerepet betöltő aminosav, a triptofán ($t_R=2,78$) mellett a vorikonazol ($t_R=4,68$) szelektíven meghatározható (**12. ábra**) legyen.



12. ábra Vorikonazol és a triptofán UV kromatogramja

A vorikonazol elválasztását Agilent 1100-as HPLC készülékkel (Agilent Ltd., Waldbronn, Németország) végeztem el fordított fázisú oszlop (4,6 mm x 150 mm, 5 µm) használatával szobahőmérsékleten. Izokratikus elúció (70% ACN: 30% 0.05 M nátrium-hidrogénfoszfát puffer) mellett 10 µl injektált mintatérfogatot alkalmazva 0,7 ml/perc áramlási sebességnél 254 nm-en DAD detektorral határoztam meg a vorikonazol mennyiségét.

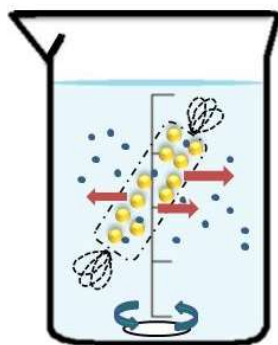
3.2.3.3. Differenciál pásztázó kalorimetria (DSC)

A liofilizált mintákon végeztem el a differenciál pásztázó kalorimetriás vizsgálatokat. A szilárd por mintából 2 mg-ot fém mintatartóba mértem be. Referencia anyagként egy üres mintatartót, tehát a levegőt vettem alapul. Majd mindkét mintatartót behelyeztem a DSC (Seiko Exstar 6000 DSC, Chiba, Japán) készülék fűthető

kemencéjébe. A mintákat (vorikonazol, HSA, HSA és vorikonazol fizikai keveréke, VCZ albumin nanorészecske) 10 °C/perc fűtési sebességgel 0 °C-ról 270 °C-ig fűtöttem fel.

3.2.3.4. Hatóanyagleadás vizsgálata

Az albumin nanopartikulumok *in vivo* hatóanyagleadó képességét *in vitro* dinamikus dialízis segítségével prediktáltam. A liofilizált mintát rehidratáltam 2 ml vízben. A minta 0,5-es ml részletét két végén hermetikusan zárt dializáló membráncsőbe helyeztem. A dializáló membránt 25 ml PBS puffert és 10% HSA-t tartalmazó kioldóközegbe helyeztem. A PBS puffer alkalmazása biztosította a kioldóközeg izotonicitását. A HSA tartalom egy fiziológiás, biokompatibilis felületaktív anyag szerepét töltötte be a rendszerben, ami biztosította, hogy a vorikonazol oldódjon ebben a vizes közegben. Mágneses fűthető keverő segítségével 37 °C-on 100 fordulat/perces kevertetés mellett 24 órán keresztül követtem nyomon a nanorészecskék hatóanyagleadását. Meghatározott időpontokban (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 és 240 perc) vettem 0,5 ml mintát a kioldóközegből, majd a minta térfogatát friss kioldóközeggel pótoltam, fenntartva ezzel a koncentráció grádienszt a rendszerben. A **13. ábrán** látható a használt dializáló cella sematikus ábrája, ahol a kék gömb jelöli a hatóanyagot, a sárga a nanorészecskét. A piros nyíl mutatja a hatóanyag áramlását. A dializáló cella pórusmérete miatt csak a felszabadult hatóanyag képes kiáramlani a dializáló közegbe, így szelektíven mérhető a szabad hatóanyag tartalom. A kioldódott hatóanyag mennyiségét a már leírt HPLC módszer (3.2.3.2.) segítségével határoztam meg.



13. ábra Az *in vitro* hatóanyagleadó képesség vizsgálata dializáló zsák segítségével
(saját készítésű ábra)

3.2.4. *A szilárd lipid nanorészecskék karakterizálására használt módszerek*

3.2.4.1. Szilárd lipid nanorészecske méretének meghatározása

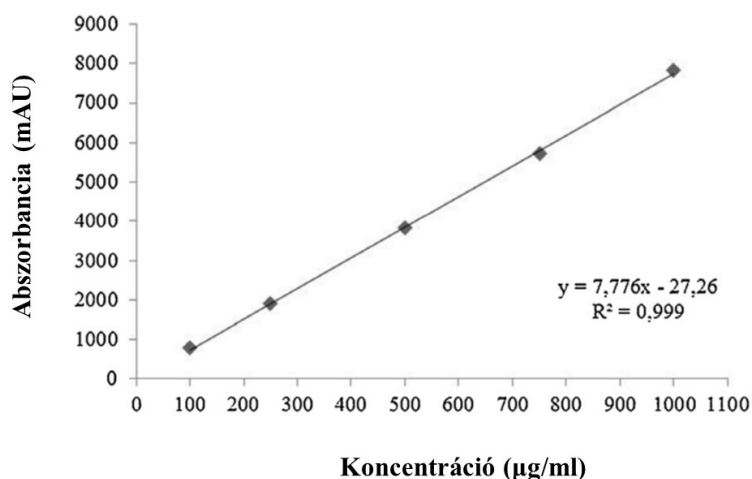
A szilárd lipid nanorészecskék részecskeméret meghatározását a lézeres fényszórás mérésén alapuló Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Ins., Dublin, Írország) **(11.ábra)** készüléken végeztem el. A mérést 25 °C-on végeztem, a hígítatlan mintát PCS115 üveg küvettába töltöttem. Beállított refraktív index érték: 1,425 volt. A diszperziós közegnek a vizet vettem.

3.2.4.2. A szilárd lipid bezárási hatásfokának meghatározása

A lipid nanorészecskék által bezárt mennyiséget indirekt módon határoztam meg. 30 kDa pórusméretű ultracentrifuga filter segítségével 0,5 ml 3.2.2. fejezet szerint készített hígítatlan mintát centrifugáltam le 10 percen keresztül 12.000 g-vel. A centrifugált minta szűrlete tartalmazta azt a hatóanyag mennyiséget, ami a szabad formában nem a nanorészecskébe zárva van jelen. A szabad hatóanyag mennyiségét HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) módszerrel határoztam meg. A fordított fázisú Agilent C18 oszlopra (4,6 mm × 150 mm, 5 µm) 10 µl mintát injektáltam. A mozgó fázis 80% ACN és 20% 0,05 M nátrium-dihidrogén-foszfát puffer volt a szobahőmérsékletű izokratikus elválasztás során 0,7 ml/perc áramlási sebesség mellett. A vorikonazol lineáris koncentráció tartománya 100-1000 µg/ml **(14. ábra)** 254 nm-nél történő detektálás esetén. A BH mennyiségét az alábbi egyenlettel számítottuk.

$$BH (\%) = \frac{\text{Összhatóanyag mennyisége} - \text{szabad hatóanyag mennyisége}}{\text{Összhatóanyag mennyisége}} \times 100 \quad (5)$$

Az összhatóanyag mennyisége ismert, mert megegyezik a kiindulási hatóanyag koncentrációjával, ha abból levonjuk az analitikai módszerrel meghatározott szabad hatóanyag mennyiségét, megkapjuk a bezárt nanopartikulumban lévő vorikonazol mennyiségét. BH a százalékosan bezárt hatóanyag mennyisége az összesen hozzáadott hatóanyag mennyiségéhez képest.



14. ábra A vorikonazol kalibrációs egyenese és annak egyenlete

3.2.4.3. Differenciál pásztázó kalorimetriás vizsgálat

A szilárd minták differenciál pásztázó kalorimetriás vizsgálatát Seiko Exstar 6000 DSC (Chiba, Japán) típusú készülékkel végeztem el. A mintából 5 mg-ot fém mintatartóba mértem be. Referencia anyagként egy üres mintatartót, tehát a levegőt vettem alapul. Majd mindkét mintatartót behelyeztem a készülék fűthető kemencéjébe. A mintákat (vorikonazol, Witepsol® W35, PPC, VCZ tartalmú SLN, üres SLN és a vorikonazol és az üres SLN fizikai keverék) 10 °C/perc fűtési sebességgel 0 °C-ról 270 °C –ig fűtöttem fel.

3.2.4.4. Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia

A következő minták FTIR spektroszkópos vizsgálatát végeztem el Alpha Bruker Corp. (California, USA) (**15. ábra**) típusú készüléken: vorikonazol, Witepsol® W35, PPC, VCZ tartalmú SLN, üres SLN és a vorikonazol és az üres SLN fizikai keverék. A spektrumot 4000–400 cm⁻¹ tartományban vettem fel.



15. ábra A gyémántfejes FTIR spektroszkóp képe (saját készítésű fotó)

3.2.4.5. A lipid nanorészecskék hatóanyagleadó képességének vizsgálata

A lipid nanorészecskék *in vitro* hatóanyagleadó képességet dializáló zsák alkalmazásával vizsgáltam. 0,5 ml mintát pipettáztam a dializáló cellába, amit ezután 25 ml PBS pufferbe helyeztem. 37 °C-os hőmérsékleten 100 rpm keverési sebesség mellett a kioldó közegből meghatározott időközönként (5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 720, 1440 perc) 0,5 ml mintát vettem, amit friss puffer hozzáadásával pótoltam. A minták vorikonazol tartalmát a már ismertetett HPLC-UV módszer segítségével határoztam meg.

3.2.4.6. A lipid nanorészecskék antimikotikus aktivitásának meghatározása

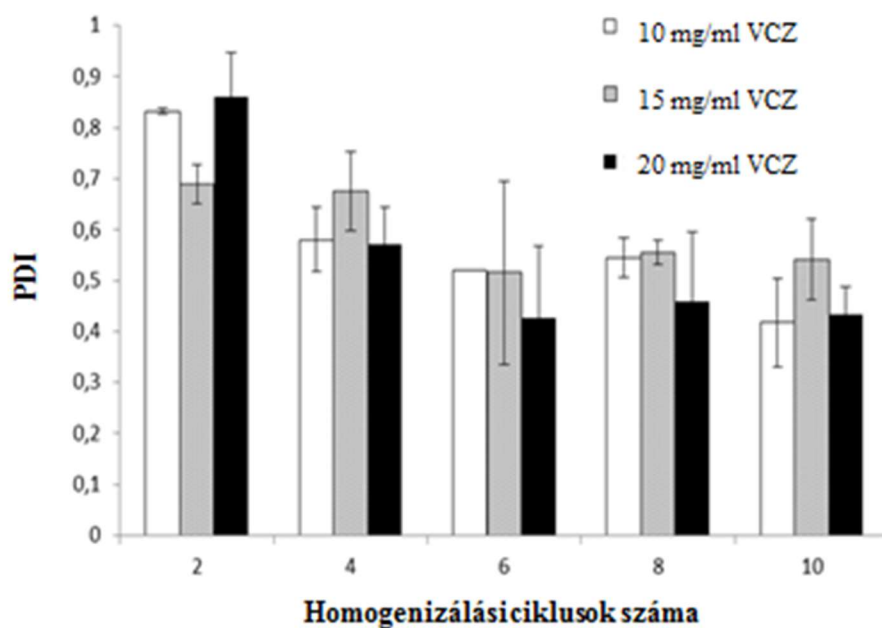
A formulált nanorészecskék antifungális aktivitását a papír diffúziós módszer segítségével határoztam meg, amit Darvas Eszter szakmai segítségével az Országos Epidemiológiai Központ Mikológiai Osztályán (Budapest) végeztem el. Két gomba törzs (*Candida glabrata*, *Aspergillus flavus*) ellen vizsgáltam a hatékonyságát. A szilárd szintetikus agar táptalaját leoltottuk a gomba szuszpenziójával. Minden Petri csészébe 3 darab Whatman No. 1 5 mm átmérőjű szűrőpapírt helyeztünk, amelyet 2 µl diszperzióval impregnáltam. Kontrollként az üres minta nélküli SLN diszperziójával kezelt szűrőpapír korongok szolgáltak. Minden Petri csészét 40 °C-on inkubáltam, majd 5 és 10 nap elteltével, tolómérő segítségével határoztam meg a gátlási zónák méretét a minták körül.

4. Eredmények

4.1. A Nab[®] technológia eredményei

Az albumin alapú nanohordozó rendszer előállítására a Nab[®] technológiát választottam, mert ezzel a technológiával megvalósítható az üzemi gyártás. A forgalomban lévő albumin nanorészecske (Abraxane[®]) is ezzel a módszerrel lett formulálva (Green és mtsai, 2006). A következő fejezetben részletesen ismertetem eredményeimet, melyeket a vorikonazol tartalmú albumin nanorészecskék előállítása során kaptam.

4.1.1. A nagy nyomású homogenizálás optimalizálása

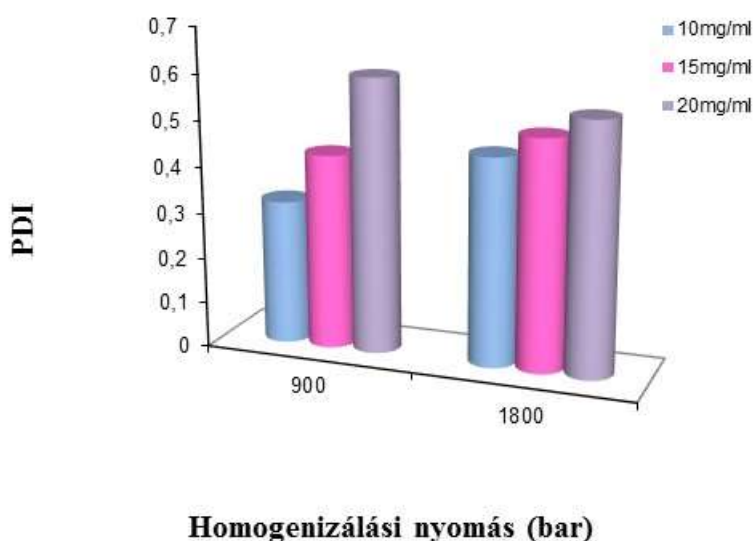


16. ábra A homogenizálási ciklusok számának hatása a PDI értékre különböző VCZ tartalmú minták esetén

A nagy nyomású homogenizálás két meghatározó paramétere a homogenizálás során alkalmazott nyomás és a homogenizálási ciklusok száma. A homogenizálási ciklusok száma leginkább a képződött nanorészecske diszperzitására van hatással, ezért több kiindulási elegy esetén vizsgáltam a PDI-re gyakorolt hatását. 2 ciklustól egészen 10 ciklusig néztük a minták részecskeméretét és eloszlását adott homogenizálási nyomás

alkalmazásával szemben. A **16. ábra** szemlélteti a kapott eredményeimet. Belátható, hogy a PDI értéke a ciklusok számának a növekedésével csökken.

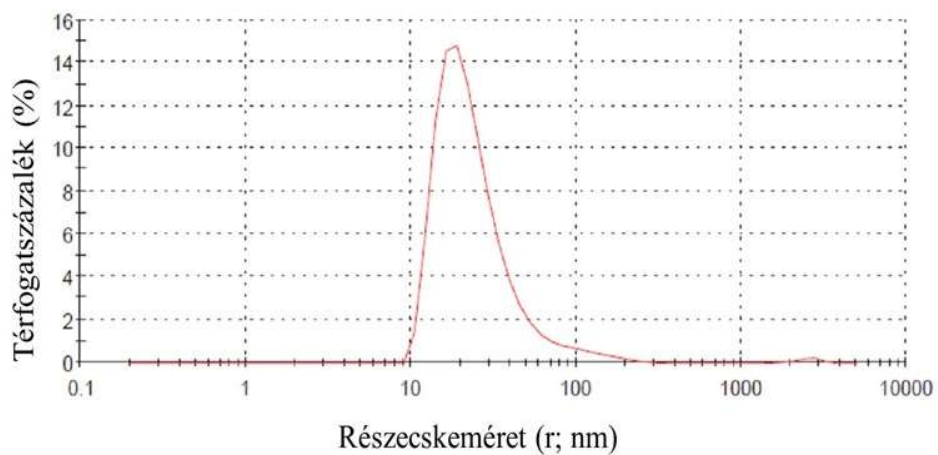
Kapott PDI eredményeimből az is látszik, hogy a magasabb homogenizálási nyomás kevésbé érzékeny a kiindulási elegy hatóanyag tartalmára, amit a **17. ábra** szemléletesen megerősít. A hatóanyag koncentrációjának növelése (10 mg-ról 20 mg-ra) 900 bar esetén 8%-kal növelte a PDI értéket, míg 1900 bar esetén ez csak 14%-os emelkedéssel járt.



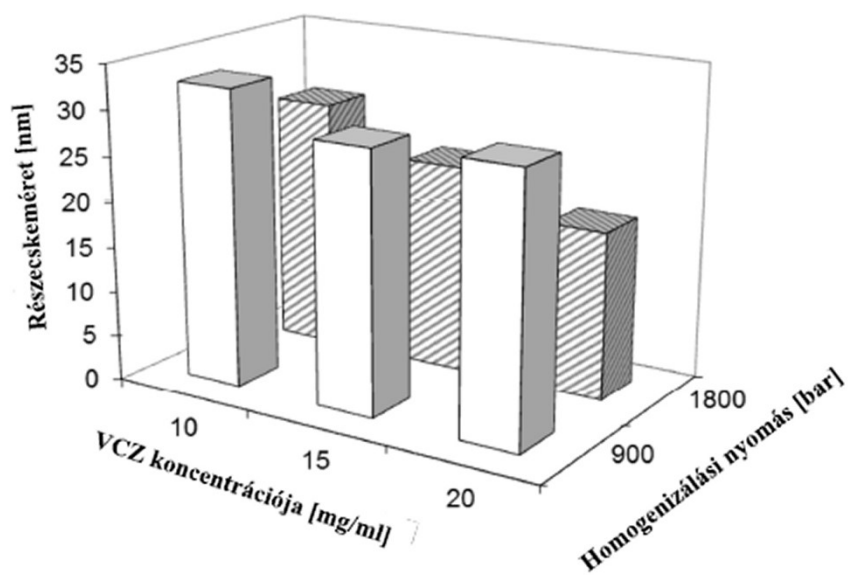
17. ábra Az alkalmazott nyomás hatása a PDI értékre különböző VCZ koncentrációk esetén (homogenizálási ciklusok száma = 6)

A részecskék méretének meghatározása során a kapott nanodiszperz rendszerünk monopopulációs eloszlást mutatott, amit a **18. ábra** demonstrál.

A részecskeméret alakulását a homogenizálási nyomás befolyásolta a legnagyobb mértékben. Azonos kiindulási vorikonazol mennyisége esetén (**19. ábra**), hogy a nagyobb homogenizálási nyomás eredményezett kisebb részecskeméretet. Továbbá az is belátható, hogy vorikonazol koncentrációjának változásával szinte alig változik a részecskeméret, a 10 mg-os mintához képest a 15 mg-os 8%-kal kisebb, míg a 25 mg-os minta 9%-kal. Az azonos összetételű minták esetén jól látható, hogy a nyomás növelésével csökken a minták részecskemérete.



18. ábra A méreteloszlás térfogatszázalékos megoszlása az egyes részecskeméretetek esetén



19. ábra Részecskeméret alakulása a hatóanyag koncentrációjának és a homogenizálási nyomás függvényében

4.1.2. A szerves oldószer eltávolítása

A módszer következő kulcslépése a szerves oldószer elpárologtatása volt, erre több technológiai megoldást próbáltam ki. A Nab® technológia esetén szükséges a rossz vízoldhatóságú hatóanyagot valamilyen szerves oldószerben feloldani és elegyíteni az albuminos oldattal, majd később a szerves fázis eltávolítható a rendszerből, ezzel biztosítva, hogy csak biokompatibilis segédanyag maradjon a nanodiszperz rendszerben. Elsődleges célkitűzésem az volt, hogy minden szerves oldószerre alkalmazható bepárló módszert dolgozzak ki.

4.1.2.1. Nitrogénárammal történő bepárlás

A tesztelt nitrogénbepárlás hátránya, hogy a nagyobb részhányadú vizes fázisú minta nehezen és csak kis mennyiségben (500 µl/kémcső) párolható be 1 napnál rövidebb idő alatt, amit kritikusnak tekintettem a folyamatos gyártástechnológia szempontjából. A visszamaradt anyagmennyiség kevés a minta karakterizálásához. Kloroformos szerves fázis alkalmazása miatt a nagyobb minta térfogat (1 ml) még 24 óra után se száradt be teljesen.

4.1.2.2. Rotációs vákuumbepárlás

A rotációs vákuumbepárlás során az R-timolkékkal festett kloroformot 3 óra elteltével sem lehetett eltávolítani a rendszerből annak ellenére, hogy a minta hőmérsékletét 15 °C-kal a szerves oldószer olvadáspontja (kloroform 60 °C) felett tartottuk. További hőmérséklet növelés nem volt lehetséges a HSA denaturálódása miatt. Ez a módszer sem bizonyult a legalkalmasabbnak a szerves oldószer eltávolítására.

4.1.2.3. Liofilizálás

A liofilizálás során kapott mintákat liofilizálási segédanyag nélkül sikerült fagyasztva szárítani. A mintákat könnyű volt rehidratálni a víz megfelelő mennyiségével.

20. ábrán látható a liofilizált minta makroszkópikus képe.



20. ábra A liofilizált minta makroszkópikus képe

4.1.3. A kiindulási elegy optimalizálása

Elsődleges célkitűzésem volt, hogy a formulált nanorendszer képes legyen az alacsony vízdoldhatóságú vorikonazolt vizes rendszerben oldatban tartani. A formuláció optimalizálásánál Chen és munkatársai által leírt tapasztalatokat vettem figyelembe (Chen W. és mtsai, 2008).

7. táblázat Összefüggés a kiindulási hatóanyag mennyisége és a bezárt hatóanyag mennyisége között.

HSA koncentráció (%, w/v)	VCZ koncentráció kloroformban (mg/ml)	Szerves és vizes fázis aránya (v:v)	Bezárt hatóanyag mennyisége (mg/ml)	Relatív oldékonyságnövelés vízhez képest (víz: 0,0978 mg/ml)
2	10	1:15	0,231 ± 0,01	2,36
2	20	1:15	0,317 ± 0,05	3,24
2	50	1:15	0,372 ± 0,05	3,81

Az után, hogy meghatároztam a nagynyomású homogenizálás körülményeit és a legalkalmasabb szerves oldószert kiválasztottam, vizsgáltam, hogy milyen hatóanyag koncentráció esetén tudjam elérni a legmagasabb bezárási hatásfok értéket úgy, hogy a formulált nanorendszer megfelelően részecskeméretét és eloszlását tekintve az albumin

nanorészecskék által elfogadott határértékeknek. A **7. táblázat** áttekintése után belátható, hogy a bezárt hatóanyag mennyisége egy adott kiindulási hatóanyag koncentráció felett már szinte alig változik. A vorikonazol mennyiségét 10 mg-ról 20 mg-ra emelve a bezárási hatóanyag mennyisége 37%-os növekedést mutat, míg a 20 mg-os és az 50 mg-os minta összehasonlításával azt kapjuk, hogy csak 17%-os az emelkedés értéke.

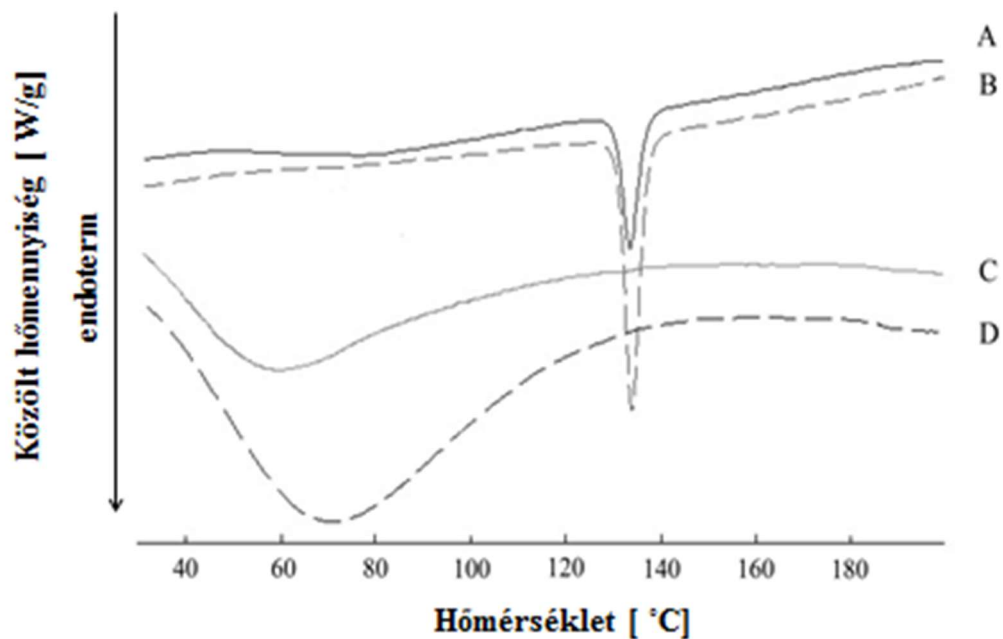
A **8. táblázat** összefoglalja, hogy hogyan befolyásolja a részecskeméretet a HSA és a kiindulási hatóanyag koncentrációja, továbbá a szerves és vizes fázis aránya. A szerves fázis arányának és a kiindulási HSA koncentrációjának növelésével nő a részecskeméret. A legalacsonyabb méreteloszlást a 10 mg-os VCZ koncentráció mellett 1:15 fázisarány esetén 2%-os HSA koncentráció jelenlétében kaptam, ezt tekintettem az optimális kiindulási elegy összetételnek, a továbbiakban ezeket a mintákat vizsgáltam.

8. táblázat A különböző kiindulási körülmények hatása a részecskeméretre és a méreteloszlásra

HSA koncentráció (%)	VCZ koncentráció kloroformban (mg/ml)	Szerves és a vizes fázis aránya (V:V)	Részecskeméret (nm)	PDI
2	10	1:10	25,6 ± 6	0,608 ± 0,24
2	15	1:10	25,8 ± 7	0,545 ± 0,15
2	20	1:10	23,4 ± 6	0,600 ± 0,17
3	10	1:15	95,6 ± 2	0,912 ± 0,13
3	15	1:15	95,1 ± 3	0,623 ± 0,53
3	20	1:15	99,8 ± 3	0,718 ± 0,35
2	10	1:15	81,2 ± 1	0,222 ± 0,01
2	15	1:15	85,4 ± 13	0,558 ± 0,02
2	20	1:15	89,7 ± 6	0,468 ± 0,10

4.1.4. A DSC vizsgálat eredménye

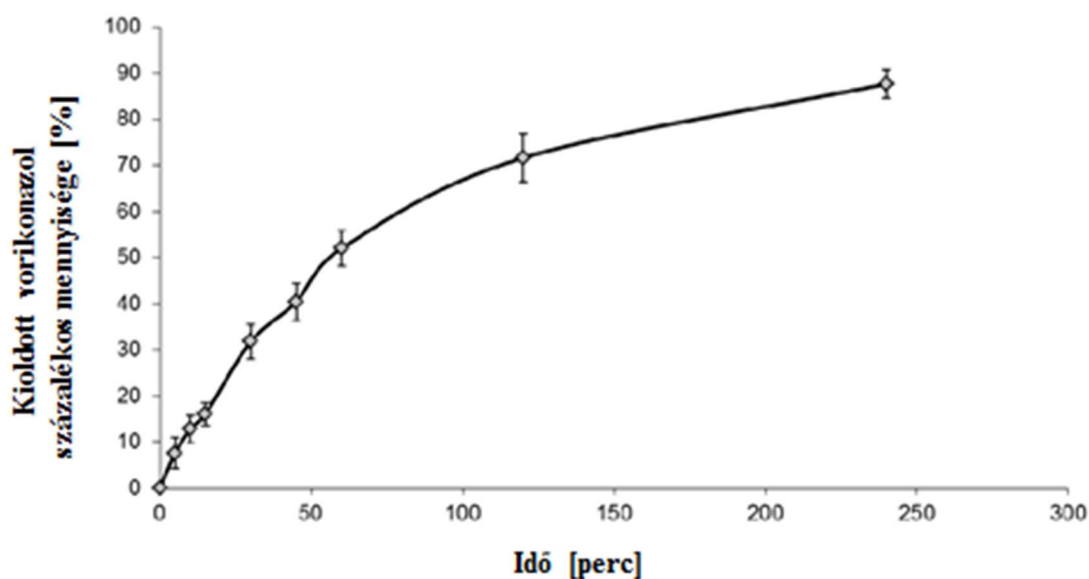
A vizsgáló módszer alkalmas arra, hogy a szilárd anyagok fizikai állapotáról tájékoztatást kapjunk. A **21. ábra** mutatja be a nanorészecske, a VCZ, a HSA és a fizikai keverékük DSC görbáját. A vorikonazol DSC görbájén könnyen meghatározható a hatóanyag olvadáspont értéke (127 °C). A HSA heterogén szerkezetéből adódóan az olvadáspont értéke 70 °C körül mozog. A fizikai keverékükben megfigyelhető a vorikonazol olvadáspontjára jellemző csúcs (A görbe), míg a nanorészecskében ez nem látható.



21. ábra A vorikonazol és HSA fizikai keverékének (A); a vorikonazolnak (B);
a vorikonazol albumin nanorészecskének (C);
és a humán szérum albuminnak (D) a DSC termogramma

4.1.5 Az albumin nanorészecske hatóanyagleadó képessége

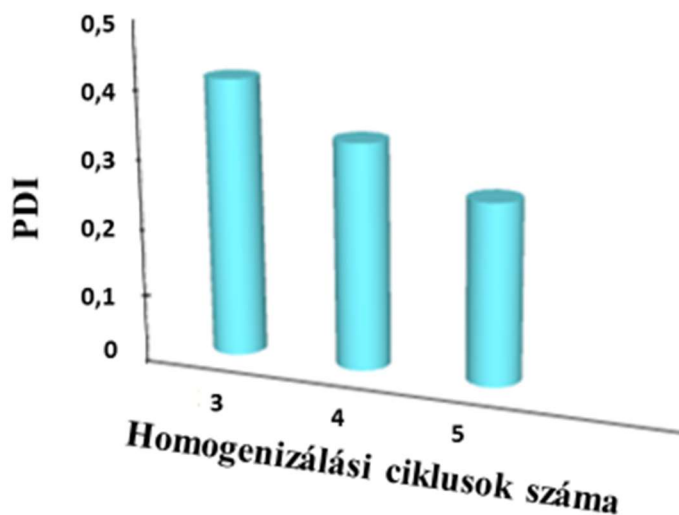
Ahhoz, hogy a formulált készítmény ki tudja fejteni hatását nem elég a hatóanyagot bezárnia magába, hanem le is kell tudni adnia. A **22. ábra** segítségével belátható, hogy a hatóanyag felszabadul a nanorészecskéből. Az *in vitro* dinamikus dialízis elvén működő kioldódás vizsgálat során a bezárt hatóanyag mennyisége felszabadul az albumin nanorészecskéből. Az első 1 óra elteltével az 50%-a, míg 4 óra után a hatóanyag közel 90%-a képes liberálódni.



22. ábra A kioldódott vorikonazol mennyisége az idő függvényében

4.2. Vorikonazol tartalmú lipid nanorészecskék formulációs eredményei

4.2.1. Lipid nanorészecskék formulálása nagy nyomású homogenizátorral

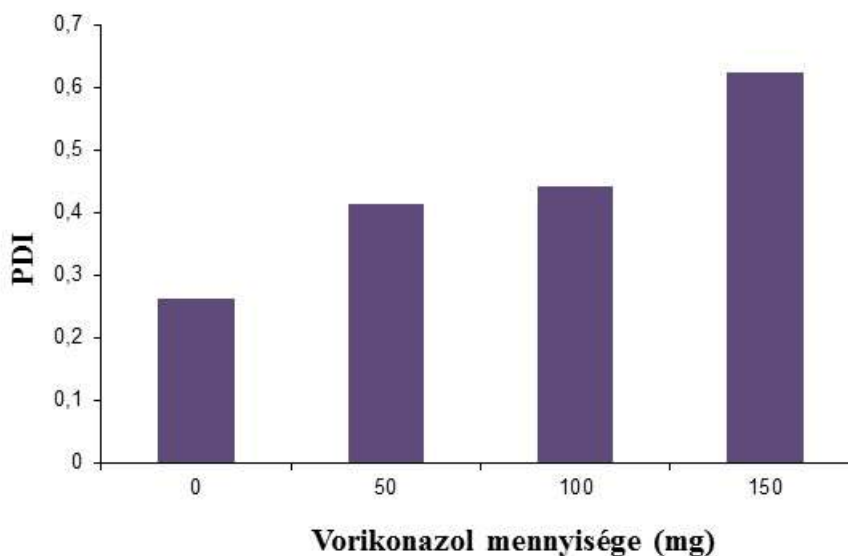


23. ábra A homogenizálási ciklusok számának hatása a PDI értékre Witepsol® W35 lipid alkalmazása esetén

A nagy nyomású homogenizálás során alkalmazott nyomás értéket a szakirodalom 300-1500 bar közé teszi lipid nanorészecskék előállítása esetén. Leggyakrabban 500-600 bar körüli nyomást alkalmazzák, mely nem emeli meg a minta hőmérsékletét oly mértékben, hogy számolni kelljen a magas hőmérséklet által indukált bomlási folyamatokkal. Körülbelül 500 bar nyomás növekedés 10 °C-os hőmérséklet emelkedés okoz a mintában (Mehnert és Mäder, 2001; Müller és *mtsai*, 2000; Yadav és *mtsai*, 2013). A homogenizálási ciklusok száma általában 3-5 közé esik. A PDI értéket a ciklusok számának növekedése többnyire csökkenti, de számos esetben a magas ciklus szám a részecskeaggregációnak kedvez és emeli a diszperzitását a nanorendszernek. Ezért minden választott szilárd lipid esetén ellenőriztük, hogy hány homogenizálási ciklus optimális a lipid nanorészecske előállításának. Az általunk formulált lipid nanorendszerek esetén a nagyobb homogenizálási ciklusszám alkalmazása kedvezett a PDI érték csökkenésének. A **23. ábra** reprezentálja a Witepsol® W35 lipid esetén kapott értékeket.

Ezért 5 homogenizálási ciklust alkalmaztam a továbbiakban a nagy nyomású homogenizálás során.

4.2.2. A kiindulási emulzió összetételének optimalizálása



24. ábra A hatóanyag mennyiségének hatása a lipid nanorészecske PDI értékére

(lipid: Witepsol® W35 mennyisége: 0,5 g)

A nagy nyomású homogenizálás paramétereinek meghatározása után következett a kiindulási emulzió összetételének optimalizálása. Az alkalmazott felületaktív anyagok és koszolvens koncentrációját maximalizáltam, hogy a humán szervezet alkalmazási helytől függetlenül képes legyen tolerálni azt.

A kiválasztott emulgeálószer nagyban befolyásolja az SLN minőségét. Koncentrációjának növelésével csökken a felületi feszültség, valamint elősegíti a részecskék feldarabolódását a homogenizáció során, aminek hatására nő az összfelület. A kiindulási emulziónk összetételében a felületaktív anyag PPC és poliszorbát 80 mennyiségét maximalizálta annak megfelelően, hogy az alkalmazni kívánt felületaktív anyag mennyisége ne érje el az 5%-os értéket, amit a humán szervezet már nem képes károsodás nélkül tolerálni. Ezek után határoztam meg, hogy mennyi lipidet és vorikonazolt képes emulgeálni az alkalmazott felületaktív anyagok.

A **24. ábra** azt mutatja be, hogy a hatóanyag koncentrációjának növekedése, hogyan rontja a képződő SLN monodiszperzitását. A **9. táblázat** foglalja össze egy választott

szilárd zsír esetén a kiindulási emulzió összetételének hatását a bezárási hatásokra a PDI-re és a részecskék méretére.

9. táblázat A kiindulási emulzió összetételének hatása a részecskeméretre, a PDI-re és a bezárási hatások értékére

Formuláció neve	Witepsol® W35 (g)	VCZ (mg)	Részecskeméret (nm)	PDI	Bezárási hatások (%)
SLN1	0,25	-	139 ± 3,2	0,261 ± 0,01	-
SLN2	0,25	50	182 ± 4,1	0,269 ± 0,01	78,79 ± 3,4
SLN3	0,25	100	215 ± 7,4	0,402 ± 0,02	89,20 ± 4,2
SLN4	0,25	150	212 ± 5,6	0,374 ± 0,02	92,99 ± 6,9
SLN5	0,50	-	179 ± 4,8	0,266 ± 0,01	-
SLN6	0,50	50	216 ± 3,6	0,373 ± 0,01	72,27 ± 5,8
SLN7	0,50	100	255 ± 3,9	0,579 ± 0,03	88,82 ± 2,4
SLN8	0,50	150	281 ± 8,5	0,615 ± 0,03	92,55 ± 1,4
SLN9	0,75	-	182 ± 7,3	0,313 ± 0,01	-
SLN10	0,75	50	189 ± 6,7	0,364 ± 0,01	70,89 ± 5,2
SLN11	0,75	100	202 ± 14,2	0,422 ± 0,02	85,86 ± 7,1
SLN12	0,75	150	218 ± 11,8	0,360 ± 0,02	90,99 ± 5,1

10. táblázat A lipid nanorendszer vorikonazol oldékonyságát növelő hatása

Formuláció neve	Bezárt hatóanyag mennyisége (mg/ml)	Relatív oldékonyságnövelés vízhez képest (víz: 0,0978 mg/ml)
SLN2	3,93	40,2
SLN3	8,92	91,2
SLN4	13,95	142,6
SLN6	3,65	37,3
SLN7	8,88	90,8
SLN8	13,88	141,9
SLN10	3,54	36,2
SLN11	8,58	87,7
SLN12	13,65	139,6

A vorikonazol koncentrációjának növelésével nem csak romlik a PDI érték, hanem nő a keletkezett részecskék mérete és méreteloszlása. A **9. táblázat** áttekintésével belátható, ha összehasonlítjuk az üres, hatóanyag nélkül SLN-ek méretét (SLN 1; SLN 5; SLN 9), a részecskék mérete nő, ha magasabb lipid koncentrációt alkalmazunk. Ugyanannyi VCZ kiindulási mennyisége esetén a magasabb lipid tartalom mellett (SLN 2; SLN 6; SLN 10) nem növekszik a bezárási határfok értéke, de növekszik a nanorendszer relatív oldékonyság növelő hatása a vízhez képest (**10. táblázat**).

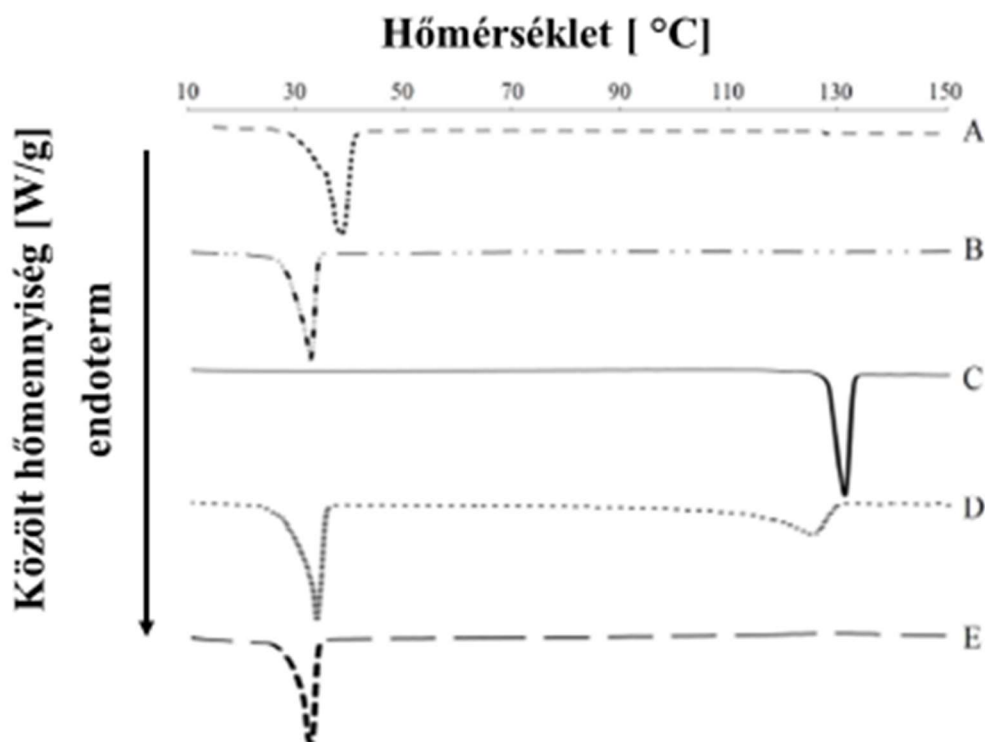
4.2.3. DSC vizsgálat eredményei VCZ-SLN esetén

A **25. ábra** bemutatja a lipid nanorészecske formulálásához felhasznált segédanyagok és a hatóanyag DSC termogramját.

A vorikonazol olvadáspontja az irodalmi adatokból ismert 127 °C körül mutatkozott meg (**25. ábra C termogram**). A Witepsol® W35 heterogén szerkezete miatt az olvadáspont értékét (35 °C) mutató endoterm csúcs szélesebb (**25. ábra A termogram**).

Az üres, hatóanyag nélküli SLN termogramjának (**25. ábra B termogram**) olvadáspont értéke alacsonyabb (32 °C), mint a Witepsol® W35 saját olvadáspont értéke.

A VCZ-SLN (**25. ábra E termogram**) termogramja is hasonló lefutást mutatott a placebo SLN-hez, nem jelent meg benne a hatóanyagra jellemző olvadáspont értéknél karakterisztikus csúcs. A fizikai keverék (**25. ábra D termogram**) esetén azonban jól elkülöníthető a lipid és a vorikonazol olvadáspontjára jellemző negatív csúcsok megjelenése.



25. ábra DSC termogramok görbái

A: Witepsol® W35, B: üres SLN; C: VCZ;

D: fizikai keveréke az üres SLN-nek és a VCZ-nek;

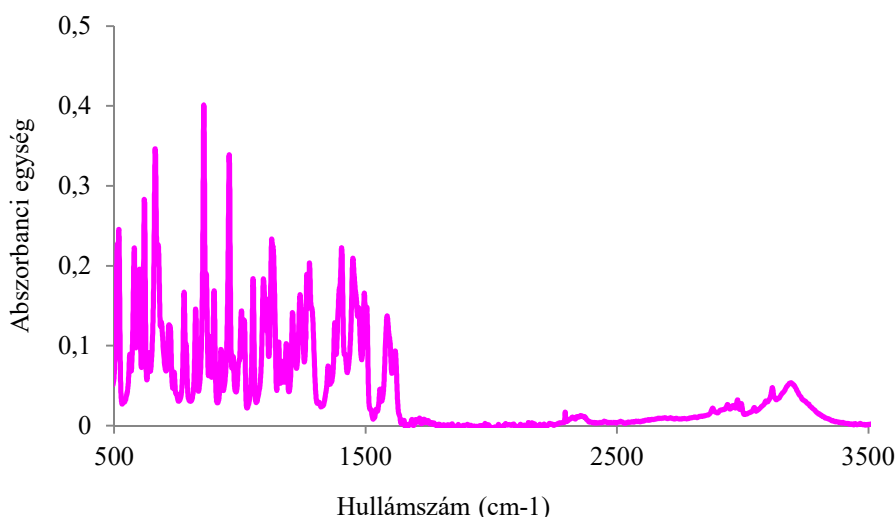
E: VCZ-SLN (SLN 2 összetétel lsd.: **9. táblázat**)

4.2.4. FTIR vizsgálat eredményei VCZ-SLN esetén

Az FTIR vizsgálat alkalmas arra, hogy a HPH során esetlegesen bekövetkező kémiai változásokról információt nyerjünk, segítségével feltárjuk a lehetséges interakciókat a hatóanyag és a foszfaditilkolin és a Witepsol® W35 között.

A VCZ infravörös spektrumában az alábbi jellemző csúcsokat azonosítottam a következő hullámszám értékeknél (26. ábra):

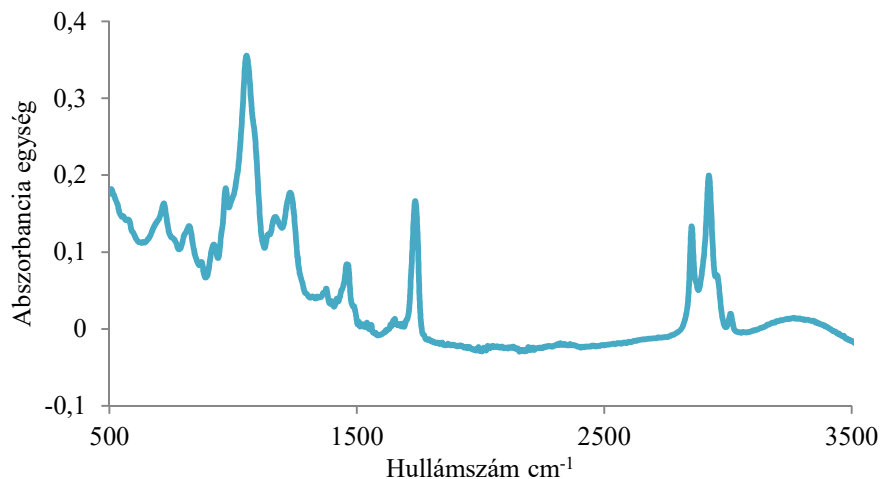
- C-O rezgést 1128 cm^{-1}
- O-H rezgést 3208 cm^{-1}
- aromás gyűrű rezgései 856 cm^{-1} , 778 cm^{-1} , 667 cm^{-1} és 663 cm^{-1}
- C-C kötések rezgései az aromás gyűrűnél 1598 cm^{-1} és 1587 cm^{-1}
- C-N kapcsolat rezgése 1279 cm^{-1}



26. ábra A vorikonazol infravörös spektruma

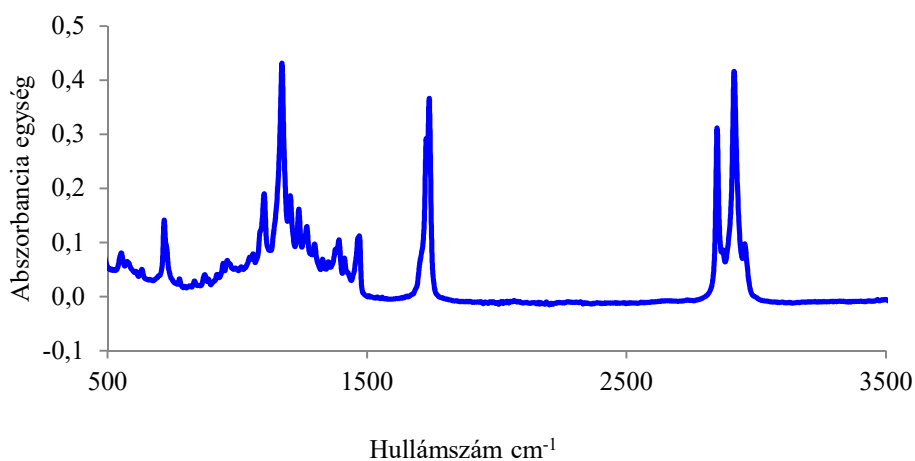
A PPC FTIR spektrumában a következő rezgéseket azonosítottam a rájuk jellemző hullámszám értékeknél (27. ábra):

- C-H kötések rezgése a hosszú szénláncú zsírsavakban 2920 cm^{-1} és 2827 cm^{-1}
- C=O kötés rezgése 1734 cm^{-1}
- P=O kapcsolat vibrációja 1237 cm^{-1}
- P-O-C kötés kapcsolata 1058 cm^{-1}
- $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ csoport rezgése 974 cm^{-1}



27. ábra A foszfatidilkolin FTIR spektruma

A **28. ábrán** látható a Witepsol® W35 infravörös spektrumában azonosított karakterisztikus csúcsok, amelyben a hosszú szánlancú zsírsavak C-H rezgései a következő hullámszámnál dominálnak 2920 cm^{-1} és 2850 cm^{-1} , míg a C=O kötés rezgései 1727 cm^{-1} -nél és 1740 cm^{-1} -nél.

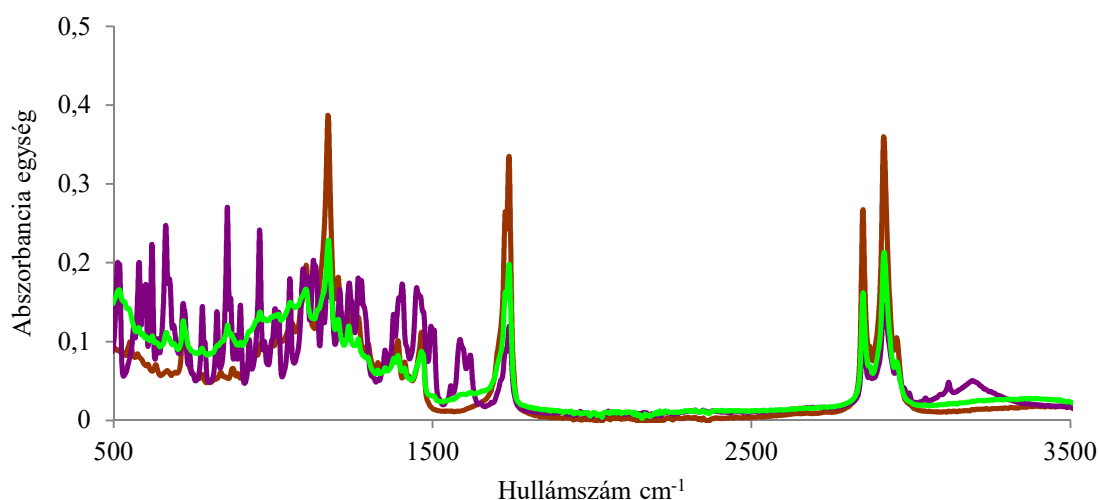


28. ábra Witepsol® W35 FTIR spektruma

A hatóanyag nélküli SLN-eket (**29. ábra** barna színű spektrum) és a hatóanyag tartalmú (**29. ábra** zöld színű spektrum) lipid nanorendszereket összehasonlítva a fizikai keverék (**29. ábra** lila színű spektrum) FTIR spektrumával azt láthatjuk, hogy a fizikai

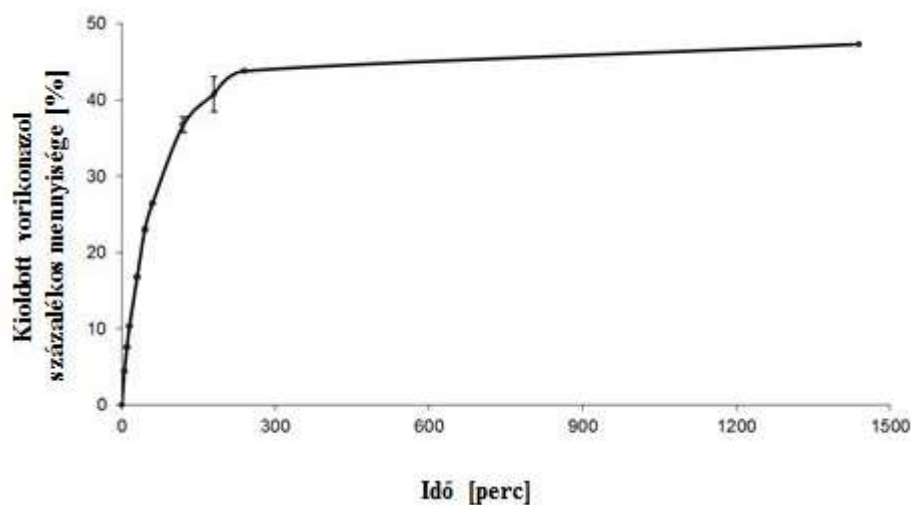
keverék spektruma megegyezik az egyes összetevők saját infravörös spektrumainak az összegzésével, míg az SLN-eket tartalmazókétől némileg eltérést mutat. A DSC után az FTIR spektrum változásai is megerősítették, hogy a lipid rész a felületaktív anyagokkal újrakristályosodik a nagy nyomású homogenizálás során.

A VCZ-SLN FTIR spektrumában nem tűnik el vagy jelenik meg egy karakterisztikus csúcs sem, de egyes csoportok rezgéseinek intenzitása csökken. Példaként emelném ki az aromás rezgések O-H kötéseinek csökkenését. Továbbá a vorikonazol spektrumára jellemző C-O kötés abszorpciós csúcs a magasabb hullámszám érték felé tolódik (1128 cm^{-1} -ről 1147 cm^{-1} -re). A spektroszkópikus változások azt sugallják, hogy a vorikonazol C-O-H kötése és az aromás gyűrűje áll kapcsolatban a segédanyaggal. Ugyanakkor a HPH során nem következik be a hatóanyag kémiai szerkezetében változás.



29. ábra A placebo SLN (barna) a fizikai keverék (lila) és a VCZ-SLN (zöld) FTIR spektruma

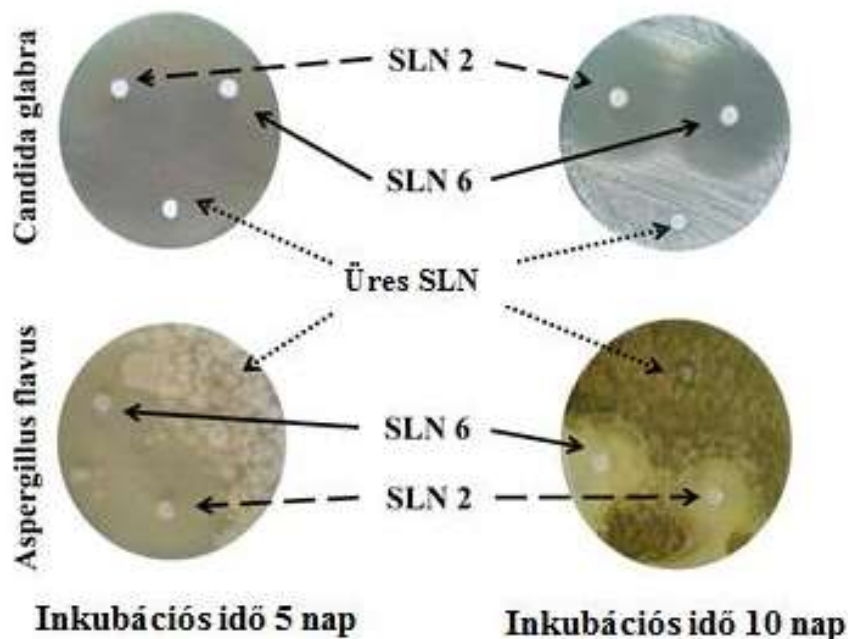
4.2.5. A VCZ-SLN *in vitro* hatóanyagleadó képességének vizsgálata



30. ábra A VCZ-SLN (SLN 2 összetétel lsd.: **9. táblázat**) *in vitro* kioldódásprofilja

Az *in vitro* dinamikus dialízis során az első 60 perc eltelte után felszabadul a hatóanyag $22,98 \pm 0,23\%$ -a. A bezárt hatóanyag mennyisége folyamatosan oldódik ki a következő 5 óra elteltével és 24 óra után alig éri el a bezárt hatóanyag 50%-os értékét (**30. ábra**).

4.2.6. VCZ-SLN antimikotikus aktivitásának vizsgálata



31. ábra Az antimikotikus vizsgálat eredménye
SLN 2 és SLN 6 formuláns (összetételt lsd.: **9. táblázat**)
és üres SLN esetén

Az antifungális aktivitás vizsgálata papír diffúziós teszt segítségével végeztem el. A kapott gátlási zónák vizsgálatával látható, hogy a segédanyagoknak nincs antimikotikus hatása, hiszen nem alakul ki az üres SLN esetén gátlási zóna (**31. ábra**). Míg az SLN 2 és SLN 6 összetételnél határozott körvonalú gátlási zóna jelenik meg mind a két gomba esetén. Az azonos hatóanyag tartalmú formulációk között az eltérő kiindulási segédanyag összetétel nem okoz szignifikáns ($p > 0,05$, $n=3$) változást a gátlási zóna méretében (pl.: *C. glabra* esetén az SLN 2: $42 \pm 1,5$ mm, míg SLN 6 esetén 44 ± 2 mm).

5. Megbeszélések

5.1 Nab[®] technológia során kapott eredmények értékelő megbeszélése

A rossz vízdoldhatóságú hatóanyagok kihívás elé állítják a gyógyszerformulálással foglalkozó kutatókat, akik igyekeznek újabb segédanyagokat és technológiákat kifejleszteni a probléma megoldására. Egyre nagyobb figyelmet kap az elmúlt évtizedben új segédanyagként egy felületaktív tulajdonsággal rendelkező fehérjemolekula, az albumin. Számos folyékony steril gyógyszerforma van jelenleg forgalomban, ami albumint tartalmaz segédanyagként. Ilyenek például az inzulin derivátumok (Levemir[®], Victoza[®]), vagy a már oly sokszor emlegetett paclitaxel hatóanyag tartalmú injekció (Abraxane[®]) (Elsadek és Kratz, 2012). A konvencionális segédanyagokkal szemben az albumin nagy előnye biokompatibilis tulajdonsága és az, hogy a humán szervezet jól tolerálja. Az emberi szervezet legfőbb endogén szállítófehérjéje a véráramban és a felszívódott hatóanyagok jelentős hányada hozzá kötve található meg. Kihhasználva a változatos kötőhellyel rendelkező albumin koszolvens viselkedését felhasználható rossz vízdoldhatóságú hatóanyagok formulációs nehézségeinek a megoldására, továbbá megvalósítható vele a célzott terápia.

A számos, albumin nanorészecske előállítására alkalmas eljárás közül a Nab[®] technológiára azért esett a választás, mert már megvalósult vele az üzemi gyógyszergyártás. Eredményeimben nagy hangsúllyal szerepel a HPH optimalizálásának folyamata, ami a technológia egyik alapköve.

A **16. ábra** ismerteti a homogenizálási ciklusok hatását a PDI értékre. Megállapítható, hogy 6 homogenizálási ciklus után, albumin alapú nanorendszerek esetén a PDI érték már alig változik. Ez az eredmény jól korrelál Liedtke és munkatársai méréseivel, ahol hasonló készülék esetén 5 ciklus után kapták ezt az eredményt (Liedtke és *mtsai*, 2000).

A **17. ábrán** bemutatott PDI értékeket vizsgálva megállapítható, hogy a magasabb homogenizálási nyomás alkalmazásával a kiindulási elegy összetételének változása kisebb változást eredményez a részecskeméret eloszlás értékeiben. Feltehetően ennek az oka, hogy a magasabb homogenizálási nyomás nagyobb áramlási sebességet biztosít a mintának, ami így ugyanolyan homogenizálási ciklus szám esetén, hamarabb okozza a részecskék homogén dezintegrálódását (Mohr, 1980).

A **19. ábra** jól demonstrálja a nyomás növekedésének hatását a részecskeméretre. A hatás a 20 mg vorikonazol kiindulási koncentráció esetén a legkifejezőbb, hiszen a nyomás kétszeresére növelése 38%-os csökkenést eredményez a részecskeméretben. Az eredmények alapján, megállapítható, hogy a vorikonazol tartalmú albumin nanorészecskék esetén legalább 6 homogenizálási ciklus szükséges az alacsony diszperzitás érték biztosításához. A magas homogenizálási nyomás esetén a PDI érték kevésbé érzékeny a hatóanyag kiindulási koncentrációjának változására, továbbá kisebb részecskeméretet eredményez.

A nagy nyomású homogenizálás optimalizált körülményeinek 1800 bar homogenizálási nyomást és a 6 homogenizálási ciklust választottam.

A szerves fázis elpárologtatására több módszert próbáltam ki. Liofilizálással sikerült a mintákat teljesen bepárolni. Hasonlóan Chen és munkatársai eredményéhez nekem sem kellett krioprotektáns alkalmaznom az eljárás során (Chen W. és mtsai, 2008). Így továbbra is csak az albumin maradt az egyetlen segédanyag a rendszerben, biztosítva ezzel a formula biokompatibilis karakterét.

Azok után, hogy kidolgoztam a nagy nyomású homogenizálás optimális paramétereit és a bepárlás módszerét, a kiindulási elegy összetételére koncentráltam. Célként tűztam ki, hogy a lehető legmagasabb bezárási hatásfok értéket kapjam úgy, hogy a formulált nanorendszer részecskeméretét és eloszlását tekintve megfeleljen az albumin nanorészecskék esetén elfogadott határértékeknek. Ezek a határértékek nem olyan szigorúak és szabályozottak, mint egy hagyományos makroméretű gyógyszerhordozó esetén. Miután az albumin alapú nanorendszerek elsődleges alkalmazási helye az érpálya, ezért nem lehet 150 nm átmérőjűnél nagyobb a részecske a trombocita aktiválódás miatt, és túl kicsi sem (50 nm >), mert akkor nem lehet szisztémás hatást kiváltani vele hiszen beadás követően gyorsan eliminálódik az érpályából (Zhang Y., 2011). Azért, hogy a fejlesztett vorikonazol nanorészecskék akár parenterális alkalmazásra is kerülhessenek, a fent leírt részecskeméret határokat kívántam tartani. Így azt a szerves oldószert, a kloroformot, választottam, amivel sikerült a kívánt részecskeméret tartományt elérni. A nanorészecskék másik kritikus paramétere a méreteloszlásuk mérőszáma, a PDI, ami minél kisebb, annál kedvezőbb, hiszen annál szűkebb tartományban mozog a

részecskeméret, azonban nincsen rá általánosan elfogadott pontos határérték, nanorészecskék típusának megfelelően változhat. Általában monodiszperz rendszernek, tehát keskeny méreteloszlás tartománnyal rendelkezőnek tekintjük a mintát, ha a PDI érték 0,3 alatt van.

11. táblázat Nab[®] technológia esetén vizsgált paraméterekről és hatásaikról

Nab[®] technológia lépése	Vizsgált változók	Következtetés
Kiindulási körülmények	<ul style="list-style-type: none"> • Humán szérum albumin megfelelő koncentráció: 2%; 3% • hatóanyag koncentráció (10, 15, 20, 50 mg) • szerves fázis (kloroform, etanol, izopropil-alkohol) • szerves és vizes fázis aránya (1:10; 1:15) 	<p>A magas humán szérum albumin koncentráció több hatóanyagot képes oldatban tartani, de a nagynyomású homogenizátorban a magas koncentráció habot képez.</p> <p>Vizes fázissal nem elegyedő kloroform ideális szerves fázisnak bizonyult 1:15 arányban a vízhez képest.</p>
Homogenizálás	<ul style="list-style-type: none"> • előhomogenizálás szükségessége • homogenizálási nyomás (900, 1800 bar) • homogenizálási ciklusok száma (2; 4; 6; 8) 	<p>Szükséges az előhomogenizálás kloroform esetén. Magasabb nyomás esetén robosztusabb nanorészecskék keletkeznek, mert kevésbé érzékeny a kiindulási paraméterek változására. 6 homogenizálási ciklus szükséges a PDI csökkentéséhez.</p>
Szerves oldószer eltávolítása	<ul style="list-style-type: none"> • nitrogén bepárló • rotációs vákuumbepárló • liofilizálás 	<p>A HPH maximális oldattérfogata 15 ml a minták tényleges szerves oldószer mentesítésére a liofilizátor bizonyult a legalkalmasabbnak.</p>

Magasabb bezárási hatásfok értéket a nagyobb kiindulási koncentráció alkalmazásával értem el, azonban a képződött nanorendszer részecskeméretét és eloszlását kedvezőtlenül befolyásolta a magasabb kiindulási hatóanyag koncentráció.

Ha a vorikonazol mennyisége ötszörösére nőtt, a bezárási hatásfok csak kevesebb, mint a kétszeresére emelkedett. Ez arra enged következtetni, hogy egy adott HSA koncentráció esetén maximált a bezárható hatóanyag mennyisége. Ugyanakkor, ha növelem a HSA koncentrációját a nanorészecskék átlagos mérete is nőni fog (ld.: **7. és 8. táblázat**).

A 3%-os HSA alkalmazása esetén a fehérje felületaktív tulajdonsága miatt már az előhomogenizálás során habot képzett, ami megnehezítette a reprodukálható mintabevitelt, bizonytalanságot okozva a minta hatóanyag koncentrációjának meghatározásában. Ezért választottam a 2%-os HSA koncentrációt. A részecskeméret értéke az 1:15 szerves:vizes fázis arány esetén esett bele a kívánt 50-150 nm-es tartományba. A kiindulási hatóanyag koncentráció növelésével, ugyan növelhető a bezárási hatásfok értéke (**7. táblázat**), de nem olyan mértékben, mint ahogy a PDI érték hátrányosan növekszik (**24. ábra**). A **11. táblázat** összefoglalja és segíti áttekinteni a vizsgált paramétereket és azok hatását az alkalmazott Nab[®] technológia esetén.

A fenti megfontolások alapján az optimális kiindulási elegy összetételének a 2%-os HSA koncentrációt és az 1:15 kloroform: víz fázisarányt választottam 10 mg-os VCZ mennyiséggel, mert $81,2 \pm 1$ nm átlagos részecskeméret értékhez, alacsony PDI ($0,222 \pm 0,01$) érték tartozik, ami így biztosítja a nanorendszer monodiszperzitását. Az összetétellel több, mint kétszeres oldékonyságnövekedést tudtam elérni.

A DSC görbék felvétele után megállapítható, hogy a hatóanyag és az albumin nem egy fizikai keveréket alkot a nanorészecske formában, hiszen a fizikai keverékükhöz képest nincs jelen a hatóanyagra jellemző csúcs (**25. ábra**). A vorikonazol az albuminhoz kötődik, és nincs jelen a kristályos formában, ami arra utalhat, hogy a hatóanyag és a HSA között a nagy nyomású homogenizálás hatására nem csak fizikai kölcsönhatás alakul ki.

A kialakult kapcsolat az albumin és a vorikonazol között nem irreverzibilis folyamat eredménye, hiszen a kioldódás vizsgálat megerősítette, hogy a formulált hatóanyag hordozó nanorendszer képes a vorikonazol mennyiségének 50%-át leadni egy óra után.

A vorikonazolt tartalmazó optimált albumin nanorészecske eredményei ígéretesnek tűnnek egy új biokompatibilis folyékony gyógyszerforma kifejlesztéséhez (Füredi és mtsai., 2016). Sikerült a rossz vízoldhatóságú hatóanyag oldékonyságát kétszeresére növelni, azonban ez az eredmény távol esik a szisztémás terápiás hatást biztosító koncentráció értéktől.

Az albumin alapú nanorészecskék formulációs eredményei arra utaltak, hogy ha potens készítmény alapjait szeretnénk lefektetni vorikonazol tartalmú nanorendszerek segítségével más nanohordozó rendszert kell használnunk. A választás lipid alapú nanorendszerekre esett, mert a hagyományos micellák és liposzómákhoz képest kevesebb felületaktív anyag alkalmazásával nagyobb mennyiségű hidrofób hatóanyagot tudnak magukba zárni.

5.2 A formulált VCZ tartalmú LN-kék eredményeinek a megbeszélése

A lipid nanorészecskék formulálása szintén a nagy nyomású homogenizátor segítségével történt, hasonló megfontolásból, mint az albumin nanorendszer esetén, hiszen ezzel a technológiával már megvalósított az ipari gyártás. Az irodalom SLN-ek esetén gazdagabb a nagy nyomású homogenizálás paramétereit illetően, mint a Nab[®] technológia, ezért elfogadtam a már több esetben ideálisnak vélt 600 bar nyomásértéket. Az SLN 5 formuláció esetén 36,5%-os csökkenést mértem a PDI értékben, ha a HPH homogenizálási ciklusainak a számát 3-ról 5-re változtattam. Ez vezetett ahhoz, hogy a homogenizálási ciklusok optimális számát 5 ciklusnak találtam a **23. ábrán** szemléltetett eredmények alapján. Látható, hogy az albumin nanorészecskékhez hasonlóan itt is a magasabb homogenizálási ciklus szám eredményezett alacsonyabb PDI értéket.

A HPH körülményeinek meghatározása után a megfelelő lipid kiválasztása következett. Nemcsak a homogenizálási paramétereknek van hatása a kialakult részecskék méretére, hanem az alkalmazott lipid típusának is (Hippalgaonkar és mtsai, 2013). Először is a hatóanyag nélküli lipid nanorészecskéket vizsgáltam a választott három lipid (sztearinsav, Compritol[®] 888 ATO, Witepsol[®] W35) esetén. Habár Khare és munkatársai szerint a sztearinsav ideális lipid hordozónak bizonyult a vorikonazol esetén mikroemulziós és ultraszonikációs módszer alkalmazásához, a tapasztalataim azt mutatják, hogy az általam választott HPH technikával és felületaktív anyag mennyiségével nem optimális a használata (Khare és mtsai, 2016). Ugyanerre a következtetésre jutottunk Compritol[®] 888 ATO esetén is, habár mikroemulziós módszer alkalmazásával Andrade és munkatársai sikeresen formuláltak vorikonazol tartalmú lipid nanorészecskéket (Andrade és mtsai, 2016). Az általam alkalmazott felületaktív anyag mennyiség esetén HPH technikával nem sikerült 0,5 µm-nél kisebb nanorészecskéket előállítani Compritol[®] 888 ATO használatával, továbbá a keletkezett nanodiszperzió PDI értéke több volt 0,8-nál. Az ilyen magas PDI érték már a lipid nanorendszer heterodiszperzitását jelzi (Gaumet és mtsai, 2008). A magas részecskeméret kialakulásának oka lehet, hogy a magasabb olvadáspont értékkel rendelkező lipidek esetén (sztearinsav olvadáspontja : 69-70 °C; Compritol[®] 888 ATO: 60-67 °C) magasabb lesz a diszperzió viszkozitása, ami a HPH során nagyobb átlagos részecskeméretet eredményez (Calvor és Muller, 1998). Witepsol[®] W35 alkalmazása során minden lipid

koncentráció esetén 300 nm-nél kisebb részecskeméretű nanorendszer keletkezett kedvezőbb PDI értékkel, ellentétben a másik két lipid esetén kapott eredményekkel.

Ezen megfontolások után a lipid hordozónak a Witepsol® W35-öt választottam.

A vorikonazol koncentráció változtatásának vizsgálatával, megállapítottam, hogy ha el akarjuk kerülni a széles méreteloszlást, akkor az alacsonyabb hatóanyag koncentrációk a kedvezőek (**9. táblázat**). A bezárási hatásfok eléréséhez nem szükséges magasabb lipid koncentrációt alkalmazni, mert nem növelte a bezárt hatóanyag százalékos mennyiségét. A BH érték gyakorlatilag független a lipid mennyiségétől, az alacsonyabb Witepsol® W35 mennyiség alkalmazásával is sikerült a legmagasabb vizsgált VCZ mennyiség (150 mg) közel 90% -kát bezárni. SLN 3 esetén ez az érték 89,2%, míg SLN 7 esetén 88,8%. A hatóanyag koncentrációjának kétszeresére növelése a bezárási hatásfok értékét 10% -kal növeli meg. A 10%-os növekedés mutatja, hogy a BH mennyisége jobban függ az alkalmazott VCZ mennyiségétől, mint a lipid mennyiségétől. Azonban a magasabb lipid és hatóanyag használata esetén kedvezőtlenül változik a nanorendszer karaktere, például a PDI értéke.

Ezen megfontolások eredőjeként, megállapítható, hogy a hatóanyag és a lipid koncentráció növelése növeli a részecskeméretet és a méreteloszlás értékét, ezért nem használható ki maximálisan a lipid nanorendszer oldhatóság növelő hatása anélkül, hogy romlana a keletkezett nanorendszerek karaktere (**10. táblázat**).

A lipid nanohordozó optimális összetételének a 0,25 g Witepsol® W35 és 50 mg vorikonazol tartalmú kiindulási mennyiségeket választottam, ahol a részecskék átlagos mérete $182 \pm 4,1$ nm és PDI értéke $0,269 \pm 0,01$. A bezárt hatóanyag mennyisége közel 80%-os, ami 3,94 mg/ml-es hatóanyag koncentrációnak felel meg. Ez a formuláció 40,2-szeresére növeli a vorikonazol vízoldhatóságát.

A DSC termogramok lefutásából megállapítható, hogy a hatóanyagmentes SLN olvadáspontja kisebb a szilárd zsír (Witepsol® W35) saját olvadáspontjánál, aminek feltehetően az lehet az oka, hogy a HPH során a Witepsol® W35 újrakristályosodik a felületaktív anyagok jelenlétében (**25. ábra**).

A lipid nanorészecskében nem, míg a fizikai keverékben megjelenik a vorikonazolra jellemző karakterisztikus csúcs a termogramon, ami arra utal, hogy a vorikonazol a HPH során a lipid nanorészecskékbe záródik, és szabad kristályos formaként nincs már jelen a diszperz rendszerben.

Az FTIR spektrumok felvételével megerősítést nyert, hogy a vorikonazol feltehetően a lipid nanorészecskékhez kapcsolódva található meg a rendszerben és, hogy a HPH során a kémiai szerkezete nem változik meg.

Az *in vitro* kioldódás vizsgálat bizonyította, hogy a bezárt vorikonazol képes kiszabadulni a lipid nanorészecskéből. Az első 5 óra után a hatóanyag közel 50%-a kioldódik, ami nagy jelentőséggel bír a terápiás hatás kiváltásában.

Az *in vitro* antimikotikus vizsgálat megerősítette, hogy a VCZ-SLN formulációból kiszabadul a hatóanyag, amely képes az *Aspergillus flavus* és *Candida glabra* szaporodását gátolni és ezt az alkalmazott lipid mennyisége nem befolyásolta.

Az általam optimált technológiával előállított vorikonazol tartalmú lipid nanorészecske karakterisztikus vizsgálatai igazolták, hogy a választott lipid alkalmas az antimikotikus hatóanyag nanohordozó rendszerének, mert belőle a hatóanyag felszabadul és terápiás hatását képes kifejteni (Füredi és mtsai., 2017).

6. Következtetések

Értekezésemben bemutatom egy rossz vízoldhatóságú antimikotikus hatóanyag nanorendszerekbe történő formulálását. Ehhez két típusú nanorendszert választottam, egy fehérje és egy lipid alapút. A nanorendszerek sajátosságainak ismeretében optimaltam a fejlesztett nanorendszereket, majd jellemeztem az oldékonyság növelő képességüket a modell hatóanyagomra nézve. Külön-külön értékeltem a kapott eredményeket az egyes nanorendszerek esetén.

Az értekezés új tudományos eredményeit az alábbi pontokban foglalom össze:

- Sikerült a választott hatóanyagot, a vorikonazolt a humán szérum albuminba zárni Nab[®] technológia alkalmazásával.
- Sikerült a nagy nyomású homogenizálás paramétereit optimalni vorikonazol tartalmú albumin nanorészecskék formulálására. Így 6 homogenizálási ciklus alkalmazásával 1800 bar nyomáson az előállított albumin nanorészecske az optimált kiindulási elegy összetétel mellett $81,2 \pm 1$ nm átlagos részecskeméretet eredményezett, aminek alacsony volt a polidiszperzitás index értéke.
- Az albumin nanorészecske karakterizálása során kapott eredményekből látható, hogy a vorikonazol tartalmú albumin nanorendszer nem csupán egy fizikai keverék.
- A használt HPLC-UV elválasztás segítségével a hatóanyag szelektíven meghatározható a triptofán mellett, így a módszer alkalmas mind a bezárási hatásfok mind a hatóanyagleadó képesség vizsgálatára.
- Az *in vitro* hatóanyagleadás vizsgálatával megerősíthető, hogy a hatóanyag és az albumin között reverzibilis kapcsolat alakul ki, ami képes a hatóanyagot vizes oldatban tartani.

- Az optimált eljárással létrehozott VCZ tartalmú albumin nanorészecske több, mint kétszeresére növelte a vorikonazol oldékonyságát vizes közegben.
- Az oldékonyság további növelése érdekében új lipid alapú nanorendszert sikerült formulálni nagynyomású homogenizátor alkalmazásával.
- 5 homogenizálási ciklus 600 bar nyomáson Witepsol® W35 lipid alkalmazásával sikerült SLN-eket előállítani.
- Az optimált hatóanyag- és lipidtartalmú SLN esetén az átlagos részecskeméret $182 \pm 4,1$ nm, ami $0,269 \pm 0,01$ PDI értékkel rendelkezett, mutatva ezzel a rendszer homogén méreteloszlását.
- A lipid nanorészecske formulálásával a hatóanyag oldékonysága több, mint 40-szeres a vízhez képest.
- Bár a bezárt hatóanyag mennyisége 80% és az oldékonyságnövekedés jelentős mértékű, de távol esik a szisztémásan alkalmazható terápiás koncentrációtól (Vfend injekció 10 mg/ml).
- Az antimikotikus aktivitás vizsgálat eredménye azt igazolta, hogy ha a BH hatóanyag koncentrációja a szisztémás hatás kiváltásához szükséges értéket nem is éri, lokális alkalmazás esetén a hatóanyag koncentráció (3,94 mg/ml) biztosítja a vorikonazol fungicid hatását.

Eredményeim gyakorlati alkalmazhatóságát az alábbiakban látom:

- Az optimált vorikonazol tartalmú albumin nanorendszer alapját képezheti egy új parenterális gyógyszerforma kifejlesztésének, ami csak biokompatibilis segédanyagot tartalmaz. Ehhez azonban szükséges, hogy a hatóanyag oldékonyságát tovább tudjuk növelni. Ennek egyik lehetséges módja lehet a továbbiakban, ha növeljük a vorikonazol affinitását az albuminhoz például a fehérje szerkezeti módosításával, vagy az albumin nanorészecskék formulálásához más módszert alkalmazunk, ami azonban a nagyüzemi gyártás megvalósulását fogja nehezíteni.
- A lipid nanorészecskék alapját képezhetik egy új, anitfungális hatóanyag tartalmú topikális készítmény, például szemcsepp fejlesztésének, hiszen az alacsony felületaktív anyag koncentráció miatt a cornea irritációval sem kell számolni, továbbá kihasználható az SLN-ek mukoadhezív tulajdonsága. Hiánypótló lenne a formuláció, hiszen jelenleg nincs forgalomban vorikonazol tartalmú szemcsepp, ezért klinikai szükség esetén az injekciót alkalmazzák (Dupuis és *mtsai*, 2009; Malhotra és *mtsai*, 2014). Sobolenska és munkatársai azonban a cornea epithél sejteinek a károsodását figyelték meg, amennyiben az injekció segédanyagának, SBE- β -CD-nek a terhelése 0,08 mg/ml/nap felett van (Sobolewska és *mtsai*, 2015). Egy új VCZ tartalmú LN alapú szemcsepp forgalomba kerülése hiánypótló lenne a gombás szemfertőzések kezelésében.

7. Összefoglalás

A rossz vízdoldhatóságú hatóanyagok formulációs nehézségei kihívás elé állítja a technológusokat, ezért újabb segédanyagok és technikák után kutatnak a probléma megoldására. A hagyományos, szolubilizálón, pH beállításon alapuló módszerek mellett a részecskeméret csökkentés jelent meg az elmúlt évtizedben, mint új oldhatóságnövelő eljárás.

A választott modell hatóanyag a vorikonazol rossz vízdoldhatósággal rendelkezik, ami nehezíti a hatóanyag folyékony gyógyszerformába történő formulálását. Ezért a nanorészecskék jó jelöltek arra, hogy bezárják a vorikonazolt, ezzel növelve a vízdoldhatóságát és a terápiás hatását a gombás fertőzésekkel szemben.

Számos kolloid nanohordozót fejlesztettek ki mostanáig. Az egyik ilyen a humán szérum albumin alapú nanorendszer, ami egyre nagyobb figyelmet kap, biokompatibilis tulajdonsága miatt.

Kutatómunkám célja volt, hogy optimáljam a vorikonazol tartalmú albumin nanorészecskék előállításának folyamatát, úgy mint a HPH illetve a technológiai folyamat kritikus paramétereit a megfelelő részecskeméret, PDI elérése érdekében. 6 homogenizálási ciklus után 1800 bar-on sikerült $81,2 \pm 1$ nm átlagos részecskeméretű albumin nanorészecskéket előállítani. Habár a bezárási hatásfok értéke $69,7 \pm 4,2\%$ -os és a vízdoldhatósága a farmakonnak több, mint kétszeres volt, mint a hatóanyagnak önmagában, ez az érték még mindig messze volna a terápiás koncentráció értékétől. Ezért szükségessé vált olyan új, ugyancsak modern nanorendszer alkalmazása a VCZ oldékonyságának növeléséhez, mint amilyenek a lipid nanorészecskék.

Kutatómunkám másik célja ezért az volt, hogy lipid alapú nanorendszert állítsak elő HPH alkalmazásával. 600 bar homogenizálási nyomás használatával 5 homogenizálási ciklus után sikerült alacsony PDI értékkel rendelkező vorikonazol tartalmú Witepsol® W35 lipid alapú nanorészecskéket előállítani. A DSC és az FTIR vizsgálatok megerősítették a szilárd lipid nanorészecskék képződését. Az *in vitro* dialízis teszt és az antimikotikus vizsgálat megerősítette, hogy a nanorendszerbe ágyazott hatóanyag képes felszabadulni és gátolni a gombaszaporodását. Ezért az új SLN hatóanyag leadó rendszer ígéretes alternatívája lehet a helyi gombás fertőzések kezelésének.

8. Summary

Poor solubility of drugs has always been an issue for formulation scientists thus the search for novel excipients or techniques is an ever-important field in the pharmaceutical developments. Besides the conventional solubilizers or pH adjusters and methods in the past decades particle size reduction is one of the new techniques to enhance the solubility of poorly water soluble drugs.

Voriconazole (VCZ), the model active pharmaceutical ingredient, exhibits low water solubility making the drug difficult to administer in liquid preparation, therefore nanoparticles can be good candidates to encapsulate VCZ, potentially increase its water solubility and its therapeutic efficacy in the treatment of fungal infection.

Until now several colloidal carrier systems have been evaluated. One of the colloidal carrier systems is the human serum albumin based nanoparticles. Human serum albumin has attracted the most attention as a new nanocarrier system of active pharmaceutical ingredients due to its biocompatibility and high binding capacity to hydrophobic drugs such as voriconazole.

Aim of my study was to study the development process of voriconazole loaded nanoparticles, such as the parameters of HPH and drug loading capacity. Six homogenization cycles at 1800 bar were produced VCZ loaded albumin nanoparticles with 81.2 ± 1 nm average particle size. Although, the encapsulated concentration of VCZ was $69.7 \pm 4.2\%$ and the water solubility was over 2 times greater than the API itself, it was far from the therapeutic concentration. Therefore, need to apply other nanoparticles to enhance the solubility of VCZ. The other aim of the study was to formulate VCZ loaded lipid-based nanoparticles by HPH. Applying five homogenizing cycles at 600 bar pressure resulted in VCZ-loaded nanoparticles with low PDI from the selected lipid base (Witepsol[®] W35). Both DSC analysis and FTIR spectroscopy results indicated the formation of SLN. Dialysis test and antifungal study verified that the embedded VCZ is released from nanoparticles. Despite of the fact the encapsulated voriconazole concentration didn't reach the systemic therapeutic level the released API could inhibit the reproduction of fungus. Therefore, the novel SLN drug delivery system represents a promising alternative treatment for local fungal infections.

9. Irodalomjegyzék

- Abelson MB, Anderson R. (2006) Demystifying demulcents. *Rev Ophtalm*, 13: 122-126.
- Abraham SA, Waterhouse DN, Mayer LD, Cullis PR, Madden TD, Bally MB. (2005) The liposomal formulation of doxorubicin. *Methods Enzymol*, 391: 71-97.
- Ahlin PJK, Smid KJ. (1998) Optimization of procedure parameters and physical stability of solid lipid nanoparticles in dispersions. *Acta Pharm*, 48: 257-267.
- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Let*, 8: 1-9.
- Amarnath S, Sharma US. (1997) Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int J Pharm*, 154:107-115
- Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, 120: 413-420
- Andrade LM, Rocha KA, De Sa FA, Marreto RN, Lima EM, Gratieri T, Taveira SF. (2016) Voriconazole-loaded nanostructured lipid carriers for ocular drug delivery. *Cornea*, 35: 866-871.
- Antal I, Dávid ÁZ, Fekete P, Lengyel M, Balogh E, Marton S, Zelkó R, Klebovich I. Középüzemű gyógyszer technológiai műveletek és gyógyszerkészítési eljárások. Semmelweis Kiadó, Budapest 2007: 124-142
- Antal I, Dávid ÁZ, Klebovich I, Ludányi K, Marton S, Odri S, Plachy JA. gyógyszer technológia kémiai ellenőrző vizsgálatai. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2012: 45-56
- Bhattachar SN, Deschenes LA, Wesley JA. (2006) Solubility: it's not just for physical chemists. *Drug Discov Today*, 11: 1012-1018.
- Bilensoy E, Gurkaynak O, Ertan M, Sen M, Hincal AA. (2008) Development of nonsurfactant cyclodextrin nanoparticles loaded with anticancer drug paclitaxel. *J Pharm Sci*, 97: 1519-1529.
- Brewster ME, Loftsson T. (2007) Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv Rev*, 59: 645-666.
- Buckton G, Newton JM. (1985) Assessment of the wettability and surface energy of a pharmaceutical powder by liquid penetration. *J Pharm Pharmacol*, 37: 605-609.

Burkhardt O, Thon S, Burhenne J, Welte T, Kielstein JT. (2010) Sulphobutylether-beta-cyclodextrin accumulation in critically ill patients with acute kidney injury treated with intravenous voriconazole under extended daily dialysis. *Int J Antimicrob Agents*, 36: 93-94.

Calvor A, Muller BW. (1998) Production of microparticles by high-pressure homogenization. *Pharm Dev Technol*, 3: 297-305.

Carl J, 2010. Rotary evaporator. Google Patents. US20100193140.

Cavalli R, Caputo O, Gasco MR. (2000) Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur J Pharm Sci*, 10: 305-309.

Cavalli R, Gasco MR, Chetoni P, Burgalassi S, Saettone MF. (2002) Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int J Pharm*, 238: 241-245.

Cavalli R, Marengo O, Pattarino E. (1998) The effect of the components of microemulsions on both size and crystalline structure of solid lipid nanoparticles (SLN) containing a series of model molecules. *Pharmazie*, 53: 392-396.

Chen H, Chang X, Du D, Liu W, Liu J, Weng T, Yang Y, Xu H, Yang X. (2006) Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *J Control Release*, 110: 296-306.

Chen W, Gu B, Wang H, Pan J, Lu W, Hou H. (2008) Development and evaluation of novel itraconazole-loaded intravenous nanoparticles. *Int J Pharm*, 362: 133-140.

Chonn A, Cullis PR, Devine DV. (1991) The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J Immunol*, 146: 4234-4241.

Csóka G, Marton S, Budai M, Antal I, Klebovich I. A gyógyszeres technológia fizikai ellenőrző vizsgálatai. Semmelweis Kiadó, Budapest 2008: 75-82

Desai N. (2008) Nab Technology: A drug delivery platform utilizing endothelial gp60 receptor-based transport and tumor-derived SPARC for targeting. *Drug Deliv*, 4: 37-41.

Desai N, Trieu V, Yao Z, Louie L, Ci S, Yang A, Tao C, De T, Beals B, Dykes D, Noker P, Yao R, Labao E, Hawkins M, Soon-Shiong P. (2006) Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res*, 12: 1317-1324.

Desai NP, Tao C, Yang A, Louie L, Zheng T, Yao Z, Soon-Shiong P, Magdassi S. (1999) Protein stabilized pharmacologically active agents, methods for the preparation and methods Patent No. US5916596.

- Dévay A, Antal I. A hatóanyag meghatározó fizikai-kémiai tulajdonságai. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2009a:147-170.
- Dévay A, Antal I. Hatóanyagok biofarmáciai osztályozási rendszere. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2009b:171-181.
- Dingler A, Blum R, Niehus H, Muller RH, Gohla S. (1999) Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls) - a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. *J Microencapsul* 16: 751-767.
- Dingler A, Gohla S. (2002) Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. *J Microencapsul*, 19: 11-16.
- Dokoumetzidis A, Papadopoulou V, Macheras P. (2006) Analysis of dissolution data using modified versions of Noyes-Whitney equation and the Weibull function. *Pharm Res*, 23: 256-261.
- Duchene D, Wouessidjewe D, Ponchel G. (1999) Cyclodextrins and carrier systems. *J Control Release*, 62: 263-268.
- Dupuis A, Tournier N, Le Moal G, Venisse N. (2009) Preparation and stability of voriconazole eye drop solution. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 798-799.
- Elsadek B, Kratz F. (2012) Impact of albumin on drug delivery new applications on the horizon. *J Control Release*, 157: 4-28.
- Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. (2012) Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release*, 157: 168-182.
- Faheem A, Haggag Y. (2015) Evaluation of nano spray drying as a method for drying and formulation of therapeutic peptides and proteins. *Front Pharmacol*, 6:140-45.
- Fundaro A, Cavalli R, Bargoni A, Vighetto D, Zara GP, Gasco MR. (2000) Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. *Pharmacol Res*, 42: 337-343.
- Füredi P, Kovács K, Ludanyi K, Antal I, Klebovich I. (2016) Development and characterization of voriconazole loaded nanoparticles for parenteral delivery. *Int J Pharm*, 510: 159-163.
- Füredi P, Pápay ZsE, Kovács K, Dalmadi Kiss B, Ludányi K, Antal I, Klebovich I. (2017) Development and characterization of the voriconazole loaded lipid-based nanoparticles. *J Pharm Biomed Anal*, 132: 184-189.
- Gabizon A, Martin F. (1997) Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs*, 54: 15-21.

Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. (2008) Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*, 69: 1-9.

Goshima H, Do G, Nakagawa K. (2016) Impact of Ice Morphology on Design Space of Pharmaceutical Freeze-Drying. *J Pharm Sci*, 105: 1920-1933.

Green MR, Manikhas GM, Orlov S, Afanasyev B, Makhson AM, Bhar P, Hawkins MJ. (2006) Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 17: 1263-1268.

Hafner V, Czock D, Burhenne J, Riedel KD, Bommer J, Mikus G, Machleidt C, Weinreich T, Haefeli WE. (2010) Pharmacokinetics of sulfobutylether-beta-cyclodextrin and voriconazole in patients with end-stage renal failure during treatment with two hemodialysis systems and hemodiafiltration. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 2596-2602.

Hippalgaonkar K, Adelli GR, Repka MA, Majumdar S. (2013) Indomethacin-loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery: development, characterization, and in vitro evaluation. *J Ocul Pharmacol Ther*, 29: 216-228.

Hörter D, Dressman JB. (2001) Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract 1. *Adv Drug Deliv Rev*, 46: 75-87.

Iqbal MA, Md S, Sahni JK, Baboota S, Dang S, Ali J. (2012) Nanostructured lipid carriers system: recent advances in drug delivery. *J Drug Target*, 20: 813-830.

Jahnke S, Müller RH. The theory of high-pressure homogenization, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1998:177-236.

Kaszás N, Bozó T, Budai M, Gróf P. (2013) Ciprofloxacin encapsulation into giant unilamellar vesicles: membrane binding and release. *J Pharm Sci*, 102: 694-705.

Khare A, Singh I, Pawar P, Grover K. (2016) Design and evaluation of voriconazole loaded solid lipid nanoparticles for ophthalmic application. *J Drug Deliv*, 2016: 659-670.

Kohita H, Matsushita Y, Moriguchi I. (1994) Binding of carprofen to human and bovine serum albumins. *Chem Pharm Bull*, 42: 937-940.

Komarek RJ. (1967) Device for evaporation of solvent from small samples. *J Lipid Res*, 8: 287-288.

Kovács-Kiss D. (2010) Nanotechnológia a készítményfejlesztésben. *Acta Pharm Hung*. 9: 544-550.

Kovács K, Orosz T, Stampf G, Antal I, Klebovich I, Ludányi K. (2009) Rossz vízdékonyságú hatóanyagok parenterális gyógyszerformába történő formulálásánál felmerülő problémák. *Acta Pharm Hung*, 79: 1-10.

- Kratz F, Elsadek B. (2012) Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J Control Release*, 161: 429-445.
- Kumar R, Sinha VR. (2014) Preparation and optimization of voriconazole microemulsion for ocular delivery. *Colloids Surf Biointerfaces*, 117: 82-88.
- Kurakula M, Ahmed OA, Fahmy UA, Ahmed TA. (2016) Solid lipid nanoparticles for transdermal delivery of avanafil: optimization, formulation, in-vitro and ex-vivo studies. *J Liposome Res*, 26: 288-296.
- Langer K, Balthasar S, Vogel V, Dinauer N, Von Briesen H, Schubert D. (2003) Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm*, 257: 169-180.
- LaVan DA, McGuire T, Langer R. (2003) Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nat Biotechnol*, 21: 1184-1191.
- Lee SH, Heng D, Nug WK, Chan HK, Tan RB. (2011) Nano spray drying: a novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *Int J Pharm*, 403: 192-200.
- Leuner C, Dressman J. (2000) Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm*, 50: 47-60.
- Li C, Sun C, Li S, Han P, Sun H, Ouahab A, Shen Y, Xu Y, Xiong Y, Tu J. (2014) Novel designed polyoxyethylene nonionic surfactant with improved safety and efficiency for anticancer drug delivery. *Int J Nanomedicine*, 9: 2089-2100.
- Li X, Anton N, Arpagaus C, Belleteix F, Vandamme TF. (2010) Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: the Buchi nano spray dryer B-90. *J Control Release*, 147: 304-310.
- Liedtke S, Wissing S, Muller RH, Mader K. (2000) Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics. *Int J Pharm*, 196: 183-185.
- Lin W, Coombes A, Davies M, Davis S, Illum L. (1993) Preparation of Sub-100 nm Human Serum Albumin Nanospheres Using a pH-Coacervation Method. *J Drug Target*, 1: 237-243.
- Loftsson T, Brewster ME. (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci*, 85: 1017-1025.
- Löbenberg R, Amidon GL. (2000) Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm*, 50: 3-12.
- Luke DR, Wood ND, Tomaszewski KE, Damle B. (2012) Pharmacokinetics of sulfobutylether-beta-cyclodextrin (SBECD) in subjects on hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 27: 1207-1212.

Malhotra S, Khare A, Grover K, Singh I, Pawar P. (2014) Design and Evaluation of Voriconazole Eye Drops for the Treatment of Fungal Keratitis. *J Pharm*, 2014: 490-499.

Manthena VSV, Sateesh K, Yasvanth A, Amit J, Anandbabu D, Anurag S, Narisetty ST, Omathanu P, Pradeep S, Rajesh G, Shrutidevi A, Vinod N, Ramesh P. (2004) Biopharmaceutic Classification System: A scientific framework for pharmacokinetic optimization in drug research. *Curr Drug Metab*, 5: 375-388.

Maurer JK, Parker RD, Carr GJ. (1998) Ocular irritation: microscopic changes occurring over time in the rat with surfactants of known irritancy. *Toxicol Pathol*, 26: 217-225.

Mehnert W, Mäder K. (2001) Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 47: 165-196.

Memisoglu E, Bochot A, Ozalp M, Sen M, Duchene D, Hincal AA. (2003) Direct formation of nanospheres from amphiphilic beta-cyclodextrin inclusion complexes. *Pharm Res*, 20: 117-125.

Millard J, Alvarez-Nunez F, Yalkowsky S. (2002) Solubilization by cosolvents. Establishing useful constants for the log-linear model. *Int J Pharm*, 245: 153-166.

Mishra B, Patel BB, Tiwari S. (2010) Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine*, 6: 9-24.

Mohr KH. (1980) Mechanisms of high-pressure homogenization. *Lebensmittelindustrie*, 27: 399-401.

Munster U, Nakamura C, Haberland A, Jores K, Mehnert W, Rummel S, Schaller M, Korting HC, Zouboulis CC, Blume-Peytavi U, Schafer-Korting M. (2005) RU 58841 myristate prodrug development for topical treatment of acne and androgenetic alopecia. *Pharmazie*, 60: 8-12.

Mühlen A. (1996) Feste Lipid Nanopartikel mit prolongierter Wirkstoffliberation: Herstellung, Langzeitstabilität, Charakterisierung, Freisetungsverhalten und - Mechanismen. Free University of Bern, Bern, 1996

Müller RH, Mäder K, Gohla S. (2000) Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*, 50: 161-177.

Nayak AK, Panigrahi PP. (2012) Solubility enhancement of etoricoxib by cosolvency approach. *Physical Chem*, 2012: 5-17..

Nazemiyeh E, Eskandani M, Sheikhloie H, Nazemiyeh H. (2016) Formulation and physicochemical characterization of lycopene-loaded solid lipid nanoparticles. *Adv Pharm Bull*, 6: 235-241.

Noyes AA, Whitney WR. (1897) The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J. American Chem Soc*, 19: 930-934.

Pandey R, Khuller GK. (2005) Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis. *Tuberculosis*, 85: 227-234.

Qin-bo W, Finsy R, Hai-bo X, Xi L. (2005) On the critical radius in generalized Ostwald ripening. *J Zhejiang Uni Sci B*, 6: 705-707.

Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum M. (1997) A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 2492-2496.

Schwartzberg LS, Mintzer DM, Epperson AL, Walker MS. (2012) Phase II multicenter trial of albumin-bound paclitaxel and capecitabine in first-line treatment of patients with metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 12: 87-93.

Scorzoni L, Sangalli-Leite F, de Lacorte Singulani J, de Paula ESAC, Costa-Orlandi CB, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. (2016) Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *J Microbiol Methods*, 123: 68-78.

Sebestyen Z, Szepesi K, Szabo B. (2013) Pharmaceutical applications of sulfobutylether-beta-cyclodextrin. *Acta Pharm Hung*, 83: 57-67.

Seo J, Lee C, Hwang HS, Kim B, Thao le Q, Lee ES, Oh KT, Lim JL, Choi HG, Youn YS, Byeon HJ, Lee S, Choi YW, Park ES, Lee KC, Youn YS, Yu X, Di Y, Xie C, Song Y, He H, Li H, Pu X, Lu W, Fu D, Jin C. (2016) Therapeutic advantage of inhaled tacrolimus-bound albumin nanoparticles in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse model. *Pulm Pharmacol Ther* 36: 53-61.

Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. (1999) Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev*, 12: 40-79.

Shen ZY, Ma GH, Dobashi T, Maki Y, Su ZG. (2008) Preparation and characterization of thermo-responsive albumin nanospheres. *Int J Pharm*, 346: 133-142.

Sobolewska B, Guerel G, Hofmann J, Tarek B, Bartz-Schmidt KU, Yoeuruk E. (2015) Cytotoxic effect of voriconazole on human corneal epithelial cells. *Ophthalmic Res*, 54: 41-47.

Soni N, Pandey H, Maheshwari R, Kesharwani P, Tekade RK. (2016) Augmented delivery of gemcitabine in lung cancer cells exploring mannose anchored solid lipid nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*, 481: 107-116.

Souto EB, Wissing S, Barbosa CM, Muller RH. (2004) Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm*, 18: 71-77.

Stinchcombe TE. (2007) Nanoparticle albumin-bound paclitaxel: a novel Cremphor-EL-free formulation of paclitaxel. *Nanomedicine*, 2: 415-423.

Storp B, Engel A, Boeker A, Ploeger M, Langer K. (2012) Albumin nanoparticles with predictable size by desolvation procedure. *J Microencapsul*, 29: 138-146.

Svetaz LA, Postigo A, Butassi E, Zacchino SA, Sortino MA. (2016) Antifungal drugs combinations: a patent review 2000-2015. *Expert Opin Ther Pat*, 26: 439-453.

Symchowicz S, Katchen B. (1968) Griseofulvin absorption in man after single and repeated treatments and its correlation with dissolution rates. *J Pharm Sci*, 57: 1383-1386.

Thao le Q, Byeon HJ, Lee C, Lee S, Lee ES, Choi YW, Choi HG, Park ES, Lee KC, Youn YS, Yu X, Di Y, Xie C, Song Y, He H, Li H, Pu X, Lu W, Fu D, Jin C. (2016) Doxorubicin-bound albumin nanoparticles containing a trail protein for targeted treatment of colon cancer. *Pharm Res*, 33: 616-625.

Ustundag-Okur N, Gokce EH, Bozbiyik DI, Egrilmez S, Ozer O, Ertan G. (2014) Preparation and in vitro-in vivo evaluation of ofloxacin loaded ophthalmic nano structured lipid carriers modified with chitosan oligosaccharide lactate for the treatment of bacterial keratitis. *Eur J Pharm Sci*, 63: 204-215.

Wan X, Zheng X, Pang X, Pang Z, Zhao J, Zhang Z, Jiang T, Xu W, Zhang Q, Jiang X, Seo J, Lee C, Hwang HS, Kim B, Thao le Q, Lee ES, Oh KT, Lim JL, Choi HG, Youn YS, Thao le Q, Byeon HJ, Lee C, Lee S, Lee ES, Choi YW, Choi HG, Park ES, Lee KC, Youn YS, Yu X, Di Y, Xie C, Song Y, He H, Li H., Pu X, Lu W, Fu D, Jin C. (2016) Lapatinib-loaded human serum albumin nanoparticles for the prevention and treatment of triple-negative breast cancer metastasis to the brain. *Oncotarget*, 7: 34038-34051.

Weber C, Coester C, Kreuter J, Langer K. (2000) Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int J Pharm*, 194: 91-102.

Wilson B, Lavanya Y, Priyadarshini SR, Ramasamy M, Jenita JL. (2014) Albumin nanoparticles for the delivery of gabapentin: Preparation, characterization and pharmacodynamic studies. *Int J Pharm*, 473: 73-79.

Wu CY, Benet ZL. (2005) Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res*, 22: 11-23.

Yadav N, Khatak S, Sara UVS. (2013) Solid lipid nanoparticles- a review. *Int J App Pharm*, 5: 8-18.

Yang F, Bian C, Zhu L, Zhao G, Huang Z, Huang M. (2007a) Effect of human serum albumin on drug metabolism: structural evidence of esterase activity of human serum albumin. *J Struct Biol*, 157: 348-355.

Yang L., Cui F., Cun D., Tao A., Shi K., Lin W. (2007b) Preparation, characterization and biodistribution of the lactone form of 10-hydroxycamptothecin (HCPT)-loaded bovine serum albumin (BSA) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 340: 163-172.

Yang S, Zhu J, Lu Y, Liang B, Yang C. (1999) Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *Pharm Res*, 16: 751-757.

Yiyun C, Jiepin Y. (2006) Solubilization of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the presence of tween series surfactants. *Phys Chem Liq*, 44: 249-256.

Zensi A, Begley D, Pontikis C, Legros C, Mihoreanu L, Buchel C, Kreuter J. (2010) Human serum albumin nanoparticles modified with apolipoprotein A-I cross the blood-brain barrier and enter the rodent brain. *J Drug Target*, 18: 842-848.

Zhang SF, Yan DF, Tang HY, Luo YF, Zhang P, Yang M, Wang Y, Xiao XH. (2010) Kinetic spectrophotometric study on hemolytic process of polysorbate 80. *Yao Xue Xue Bao*, 45: 538-538.

Zhang Y. (2011) Relations between size and function of substance particles. *Nano Biomed Eng* 3: 1-16.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények jegyzéke

1. Petra Füredi, Kristóf Kovács, Krisztina Ludanyi, István Antal, Imre Klebovich, (2016),
Development and characterization of voriconazole loaded nanoparticles for parenteral delivery,
Int. J. Pharm., 510: 159-163.
(IF.: 3.994 (2015))
2. Petra Füredi, Zsófia Edit Pápay, Kristóf Kovács, Borbála Dalmadi Kiss, Krisztina Ludányi, István Antal, Imre Klebovich, (2017),
Development and characterization of the voriconazole loaded lipid-based nanoparticles,
J. Pharm. Biomed. Anal., 132: 184-189.
(IF.: 3.169 (2015))

10.2. Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények jegyzéke

3. Kovacs Kristóf, Jayannaa Prashanth K., Dukea Anna, Winnera Brittany, Negritoa Melaeni, Angalakurthia Siva, Yub Jorn C.C., Füredi Petra, Ludányi Krisztina, Sipos Péter, Rockwoodc Gary A. , Petrikovics Ilona (2016)
A Lipid Base Formulation for Intramuscular Administration of a Novel Sulfur Donor for Cyanide Antagonism
Curr. Drug Deliv. 13: pp. 1351-1357
(IF.: 1.446 (2015))

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Kelbovich Imrének, amiért biztosította számomra a lehetőséget, hogy doktori munkám elkészülhessen, és értékes szakmai tanácsokkal látott el kutatásom során.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Antal István docensnek és Dr. Ludányi Krisztina docensnek, hogy mindig bátran fordulhattam hozzájuk szakmai segítségért.

Kiemelt köszönetet szeretnék mondani Dr. Kovács Kristófnak, hogy szakmai segítségével mindig támogatott, még akkor is, amikor már nem volt közvetlen munkatársam.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézet minden jelenlegi és korábbi munkatársának, akivel együtt dolgozhattam, különösen Biczók Gabriellának, Dr. Budai Líviának, Dr. Dalmadiné Kiss Borbálának, Herczegné Dr. Pápai Katalinnak, Madaneczné Alföldy Évának, Dr. Niczinger Noémi Annának, Dr. Pápay Zsófia Editnek, Szólláthné Dr. Sebestyén Zitának, hogy mindig számíthattam rájuk. Volt diákjaimnak Dr. Varga Dávidnak, Dr. Szombati Juditnak, Dr. Gulyás Eszternek, hogy diplomamunkájuk elkészítését vezetésemmel a kutatási témában végezték és érdeklődésükkel engem is motiváltak hétről hétre és évről évre.

Szeretnék köszönetet mondani Erdősi Tímeának és Darvas Eszternek, hogy biztosították a lehetőséget az antifungális aktivitás méréshez az Országos Epidemiológiai Központban.

Külön köszönetet szeretnék mondani támogatásukért szüleimnek, vőlegényemnek Görög Máténak és barátaimnak főleg azért, hogy akkor is tartották bennem a lelket, amikor én már feladtam volna.